

HYALURONAT:
ABSPALTUNGSMECHANISMUS
UND
SYNTHESERATE IM ZELLZYKLUS

Disbui. München

1988

vorgelegt von
Ulrike Mayer



HYALURONAT:
ABSPALTUNGSMECHANISMUS
UND
SYNTHESERATE IM ZELLZYKLUS

Dissertation
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt von
Ulrike Mayer
aus Ortenberg

München 1987

1. Berichterstatter: Prof. Dr. K. Kühn
2. Berichterstatter: Prof. Dr. G. Hartmann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.2.88

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, in der Abteilung für Bindegewebsforschung von Januar 1985 bis Dezember 1987 durchgeführt.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. K. Kühn, der es mir ermöglichte, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können.

Herrn Dr. P. Prehm sei besonders gedankt für seine unermüdliche, tatkräftige und selbstlose Unterstützung, sowie sein aufopferndes und stetes Interesse an dieser Arbeit und der überaus nützlichen Kritik bei der Anfertigung dieser Dissertation.

Herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. A. Martinez-Hernandes, der mir während seines in unserer Abteilung durchgeführten Sabbaticals stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Frau Dr. I. Michel und Herrn Dr. E. Pöschl danke ich für ihre stete Diskussionsbereitschaft, sowie für ihre konstruktive Kritik bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Bei Frau E. Schlosser, Herrn M. Brecht und Herrn A. Mausolf möchte ich mich für ihre Unterstützung und gute Zusammenarbeit in unserer Arbeitsgruppe bedanken.

Allen anderen Mitarbeitern der Abteilung bin ich für ihre kleinen und großen Dienste, die sie mir geduldig leisteten, zu großem Dank verpflichtet.

INHALTSANGABE

A. EINLEITUNG	1
B. AUFGABENSTELLUNG	16
C. ERGEBNISSE	17
I. Untersuchungen zum Kettenabbruch und Aktivitäten in vivo	17
1. Bestimmung der Kettenlänge bei verschiedenen Zelllinien	17
1.1 Kettenlänge von Streptokokken	17
1.1.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Hyaluronat aus Streptokokken durch Viskositätsmessung	19
1.2 Kettenlänge des Hyaluronats in B6-Zellen	22
1.2.1 Änderung des Kettenwachstums bei B6-Zellen nach Hyaluronidasebehandlung	24
1.3 Kettenlänge des Hyaluronats von SV3T3-Zellen	25
1.4 Kettenlänge des Hyaluronats in HE-Zellen	25
2. Hyaluronatsynthaseaktivitäten der Zelllinien	26
2.1 Einfluß von Hyaluronidase und Trypsin auf die Aktivität	27
2.2 Blockierung des Hyaluronatrezeptors bei SV3T3-Zellen mit Hyaluronat	30
2.3 Kettenlänge des Hyaluronats bei SV3T3-Zellen nach Blockierung des Rezeptors mit Concanavalin A (Con A)	31
3. Kettenlänge des Hyaluronats in Abhängigkeit von Radikalen	32
4. Hemmung der Proteinsynthese bei HE-Zellen	33

5.	Abspaltung des Hyaluronats in Abhängigkeit vom Zellzyklus	34
5.1	Optimierung der Zellsynchronisation	35
5.2	Hemmung der DNA-Synthese bei HE-Zellen	35
5.3	Hemmung der Mitose	35
6.	Wird die Kettenlänge durch den 'Turnover' des Enzyms bestimmt?	36
II.	Untersuchungen der Kettenlängen und Aktivitäten in vitro	40
1.	Kettenlänge des Hyaluronats bei B6-Membranen	40
2.	Einfluß der Wachstumsphase auf die Kettenlänge	41
3.	Lokalisierung des Kettenabbruchs	42
4.	Kettenlänge in Abhängigkeit der Substratkonzentration	45
5.	Kettenlänge in Abhängigkeit von Inhibitoren	47
6.	Kettenlängen und Aktivitäten in Gegenwart von Adenosinnukleotiden	49
7.	Versuch der Isolierung der reinen, aktiven Hyaluronatsynthase	58
III.	Hyaluronatsynthese während der Mitose bei HE-Zellen	62
1.	Syntheserate von unbehandelten Zellen	62
2.	Syntheserate von HE-Zellen während des	

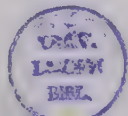
3.	Syntheserate von HE-Zellen während des Cytochalasin B Blocks	65
4.	Bestimmung von Chondroitinsulfat und Heparansulfat in Gegenwart der Inhibitoren	68
5.	Bestimmung der Hyaluronatsynthaseaktivität in vitro während des Cytochalasin B Blocks	69
6.	Hemmung der Zellteilung durch perjodat-oxidierte Zucker	71
D.	DISKUSSION	76
E.	ZUSAMMENFASSUNG	89
F.	ABKÜRZUNGEN	91
G.	MATERIALIEN UND METHODEN	93
H.	LITERATURANGABEN	111

A. EINLEITUNG

Das Bindegewebe als funktionelles Element eines differenzierten Organismus besteht im wesentlichen aus einer komplex zusammengesetzten extrazellulären Matrix, die von unterschiedlichen Zellen synthetisiert und sekretiert wird. Die Zusammensetzung und dreidimensionale Organisation dieser Matrix ermöglicht die Anpassung an die physiologischen Erfordernisse unterschiedlichster Gewebe, wie Haut, Knochen, Knorpel, Sehne oder Zähne. Mechanische Stabilität und Elastizität, aber auch Permeabilität eines Gewebes werden von den Eigenschaften dieser extrazellulären Matrix bestimmt (1). Die extrazelluläre Matrix stellt jedoch nicht nur ein mehr oder minder inertes Gerüst des Organismus dar, sondern beeinflusst durch Zell-Matrix Wechselwirkungen maßgeblich sowohl die Differenzierung als auch die phänotypische Stabilität von Geweben, aber auch Prozesse wie Zellwanderung, Zellproliferation und die Aufrechterhaltung der Zellmorphologie.

Grundbausteine der extrazellulären Matrix unterschiedlichster Gewebe sind Kollagene, Glykoproteine, Proteoglykane und Hyaluronat, wobei die Verteilung verschiedener Subtypen charakteristisch für die jeweiligen Arten und Funktionen des Bindegewebes ist. Die Kollagene stellen die im Gesamtorganismus mengenmäßig vorherrschenden Proteine dar. Aufgrund ihrer proteinchemischen Eigenschaften und ihrer gewebespezifischen Verteilung sind bisher 11 Kollagene definiert worden (2). Ihnen allen ist gemeinsam, daß sie extrazellulär zu makromolekularen Strukturen aggregieren können, die durch intermolekulare kovalente Bindungen miteinander gekoppelt sind.

Weitere strukturgebende Komponenten der extrazellulären Matrix sind die Glykoproteine Fibronektin, Laminin und Chondronektin, wovon letztere jedoch nur in hochspezialisierten Geweben zu finden sind. Ihnen kommt eine maßgebende Rolle bei Zell-Matrix Wechselwirkungen zu (3), indem sie durch Bindung an spezifische Rezeptoren auf die Anhaftung



der Zellen, Zellwanderung, Differenzierung und Regeneration der Zellen einwirken.

Die Glukosaminoglykane und Proteoglykane bilden die gallertartige Grundsubstanz der extrazellulären Matrix. Aufgrund ihrer polyanionischen Struktur sind sie extrem hydratisiert, weshalb durch Diffusion der rasche Austausch von Nährstoffen, Hormonen und metabolischen Vorläufern zwischen Blut und Bindegewebszellen ermöglicht wird. Zu den Glukosaminoglykanen werden Chondroitin 4- und 6-Sulfat, Dermatansulfat, Keratansulfat und Hyaluronat gezählt. Die sulfatierten Glukosaminoglykane sind jedoch in den Geweben nur in Form von speziellen Proteoglykanen vorhanden, während Hyaluronat ubiquitär ist. Aus dieser Gruppe ist zudem Hyaluronat das einzige Molekül, das sowohl von Prokaryonten, wie z.B. Streptokokken der Gruppe A und C (4), als auch von Eukaryonten synthetisiert wird. Hyaluronat ist ein unverzweigtes Polydisaccharid aus alternierenden β -1,3-N-Acetylglukosamin- und β -1,4-Glukuronsäureeinheiten. 50 Jahre nach seiner Entdeckung und Isolierung durch Meyer und Palmer (5) aus dem Glaskörper des Rinderauges ist seine genaue biologische Funktion und die Regulation seiner Synthese noch immer nicht bekannt.

Proteoglykane

Die sulfatierten Glukosaminoglykane sind unverzweigte Ketten aus charakteristisch sich wiederholenden Disaccharideinheiten, die aus einem Hexosamin, entweder D-Glukosamin oder D-Galaktosamin und einer -uronsäure, entweder D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure aufgebaut sind. Die einzige Ausnahme findet sich bei Keratansulfat, worin die -uronsäureeinheit durch Galaktose ersetzt ist. Außer dem Hyaluronat sind alle weiteren Glukosaminoglykane in unterschiedlichem Ausmaß O-sulfatiert. Bei Heparansulfat und Heparin konnten auch N-sulfatierte Glukosamine gefunden werden. Chondroitinsulfat, Dermatansulfat, Heparansulfat und

Heparin sind an ihrem reduzierenden Ende über die terminale Xylose kovalent an die Hydroxylgruppe eines Serinrestes des 'Core-Proteins' gebunden (6). Im Gegensatz dazu bindet Keratansulfat, je nach Vorkommen, entweder über eine N-glykosydische Bindung zwischen N-Acetylglukosamin und Asparagin (7,8) oder über eine O-glykosydische Bindung zwischen N-Acetylgalaktosamin und der Hydroxylgruppe eines Serins oder Threonins an das 'Core-Protein' (9,10).

Das Chondroitinsulfat Proteoglykan des Knorpels ist am besten untersucht und soll deshalb hier exemplarisch genauer beschrieben werden. Das zentrale Molekül des Monomers bildet das langgestreckte 'Core-Protein', das drei funktionell unterschiedliche Bereiche enthält:

- a) Eine N-terminale, globuläre Region, an die nonkovalent Hyaluronat bindet (11).
- b) Eine Keratansulfat Bindungsregion, die ungefähr 10% des 'Core-Proteins' ausmacht.
- c) Eine Chondroitinsulfat Bindungsregion, die den größten Teil des Moleküls (ca. 50%) besetzt.

An jedes 'Core-Protein' sind etwa 100 Chondroitinsulfat- und etwa 50 - 60 Keratansulfatketten O-glykosydisch gebunden. Zusätzliche Oligosaccharidketten, die zwischen die langen Seitenketten eingelagert sind, tragen zur Komplexität und polyanionischen Natur des Proteoglykanmoleküls bei (12). Neben der Variabilität der Anzahl und Anordnung der Glukosaminoglykane unterliegt auch die Länge der Ketten deutlichen Veränderungen. In frühen Phasen der Differenzierung herrschen lange Chondroitinsulfat- und kurze Keratansulfatketten vor. Dieses Verhältnis kehrt sich im Laufe der Differenzierung um (13). Trotz seiner Größe trägt das 'Core-Protein' nur zu 5 - 10% zur Masse eines Proteoglykanmonomers bei, das ein Molekulargewicht von $1 - 4 \times 10^6$ d erreichen kann.

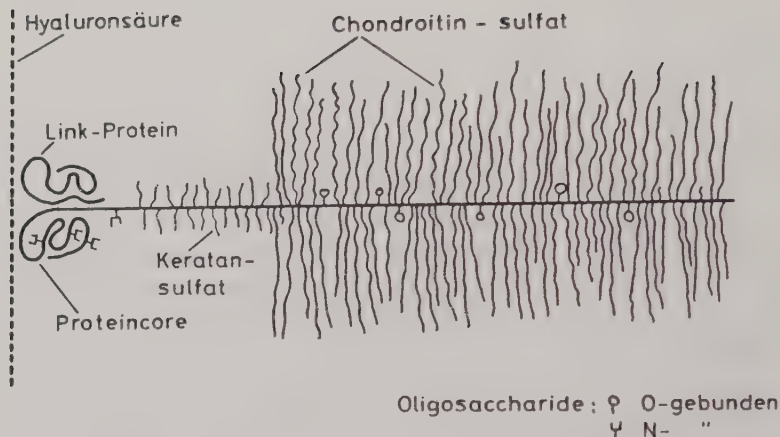


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines typischen Proteoglykanmoleküls des Knorpels.

In Gegenwart von Hyaluronat formen die Knorpelproteoglykane große, nichtkovalente Komplexe (14) (Abb. 1). Diese Bindung an Hyaluronat wird durch die 'Link-Proteine' zusätzlich stabilisiert. In Lösung sind diese Aggregate, aufgrund ihrer polyanionischen Struktur, extrem ausgebreitet und hydratisiert. Im Knorpel dagegen sind sie zwischen den Kollagenfasern und den Zellen eingelagert und liegen in einer dicht gepackten, komprimierten Matrix vor. Die dichte Packung der einzelnen Ladungen setzt einer Kompression einen stetig ansteigenden Widerstand entgegen, was für die Funktion des Knorpels von entscheidender Bedeutung ist. Ganz allgemein korreliert der Glukosaminogehalt mit der Druckstabilität der Gewebe (15).

In anderen Geweben befinden sich andere Proteoglykane, die sich sowohl in Struktur als auch in ihrer Funktion von dem beschriebenen Haupttyp unterscheiden.

Biosynthese der Proteoglykane

Alle proteingebundenen Glukosaminoglykane von Säugetiergeweben werden nach dem gleichen grundlegenden Mechanismus synthetisiert, wobei die Translation des 'Core-Proteins' an den Ribosomen des endoplasmatischen Retikulums der erste entscheidende Schritt ist. Durch die Übertragung von Xylose aus UDP-Xylose auf die Hydroxylgruppe eines Serins wird der Kettenstart der Glukosaminoglykane initiiert. Die Glukosaminoglykanketten werden schließlich im Golgiapparat durch Addition der einzelnen Zuckermoleküle aus den entsprechenden Uridinnukleotidvorläufern mit Hilfe von Glykosyltransferasen fertiggestellt. Gleichzeitig mit der Kettenverlängerung geht die Sulfatierung der Zuckermoleküle durch Transfer eines Sulfats von 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) durch entsprechende Sulfotransferasen einher.

Die N-Glykosylierungen des 'Core-Proteins' erfolgen, analog zu den Glykoproteinen, in einem kotranslationalen Prozeß (16), indem Oligosaccharidketten mit einem hohen Mannosegehalt von einem Dolicholpyrophosphat Zwischenprodukt auf ein Asparagin der naszierenden Polypeptidkette übertragen werden (17). Das fertige Proteoglykanmonomer wird durch Exocytose aus der Zelle hinausgeschleust.

Hyaluronat

Seit seiner Entdeckung ist Hyaluronat aus vielen Geweben und Gewebsflüssigkeiten isoliert worden. Große Mengen davon werden dann produziert, wenn eine hohe Viskoelastizität, wie in in der menschlichen Nabelschnur (18), der Synovialflüssigkeit (19), dem Hahnenkamm (21) oder Lichtdurchlässigkeit, wie im Glaskörper des Auges (20), erforderlich ist. Geringe Mengen lassen sich aber auch in anderen Geweben oder Flüssigkeiten wie z.B. dem Serum nachweisen (22).

Biologische Funktion des Hyaluronats

Trotz seines ubiquitären Vorkommens läßt sich die biologische Funktion des Moleküls nicht eindeutig definieren. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß Hyaluronat einen Einfluß auf viele zelluläre Prozesse, wie Zellwanderung, Differenzierung und Morphogenese ausübt (23,24).

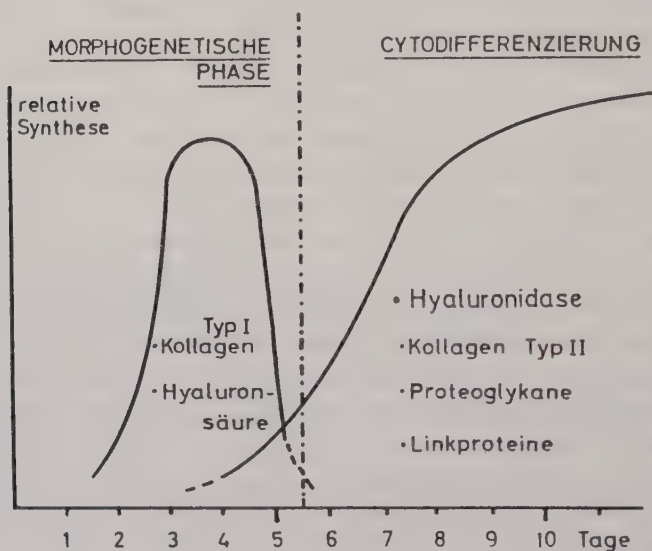


Abb. 2: Veränderungen des Hyaluronatgehalts und der Aktivität von Hyaluronidase während der Embryonalentwicklung eines Limb Buds (23).

Generell gilt, daß der Hyaluronatgehalt während der aktiven Phase der Zellwanderung und Proliferation hoch ist, aber abnimmt, wenn die Zellen beginnen zu differenzieren. In diesem Moment steigt sowohl die Hyaluronidaseaktivität als auch die Synthese von Chondroitinsulfat an (25,26) (Abb. 2),

was zu einer drastischen Veränderung der extrazellulären Matrix führt. Solch eine wechselseitige Beziehung zwischen Hyaluronat- und Proteoglykansynthese konnte auch in Chondrozyten nachgewiesen werden, wobei in diesem Fall die Zunahme von extrazellulärem Hyaluronat mit einer Abnahme der Proteoglykansynthese einhergeht (27).

Die Zellwanderung wird dadurch erleichtert, daß Hyaluronat einen hohen Hydratisierungsgrad besitzt und damit die Gewebe zum Anschwellen bringt. So wird ein zellfreier Raum geschaffen, in den die Zellen nachfolgend einwandern können (28). Die Zellwanderung wird beendet, wenn Hyaluronidasen Hyaluronat degradieren und das Gewebe unter Wasserverlust kondensiert.

Die gleiche Korrelation zwischen Zellwanderung und Hyaluronatgehalt konnte bei vielen embryonalen Geweben gezeigt werden, so bei ektodermalen Zellen während der Gastrulation (29), neuralen Leistenzellen (30) oder in Nierenmesenchym (31).

Während bei der Differenzierung von Geweben der Hyaluronatgehalt dramatisch abnimmt, läßt sich in vitro kein direkter Zusammenhang beweisen. So wird die Differenzierung von Hühnermyoblasten zu Myotuben, entsprechend der Beobachtung unter in vivo Bedingungen, vollständig inhibiert, wenn die Zellen auf Hyaluronat als Substrat kultiviert werden (32), während die Differenzierung von Chondrozyten unter gleichen Bedingungen stimuliert wird (33).

Neben der Zellwanderung beeinflusst Hyaluronat maßgeblich die Adhäsion der Zellen. Eine Korrelation zwischen hohem Hyaluronatgehalt und einer verminderten Zelladhäsion konnte von vielen Arbeitsgruppen bestätigt werden. Das zeigt sich besonders bei nur schwach am Substrat anhaftende Varianten von Ovarienzellen chinesischer Hamster (CHO-Zellen), die mehr an der Zelloberfläche assoziiertes Hyaluronat besitzen, als deren stark anhaftende Varianten (34). Ebenso können Chondrozyten, die mit Rous Sarkoma Virus transformiert sind und nur noch lose an der Matrix anhaften, mit Streptomyces Hyaluronidase, die frei von Reaktionen mit anderen Glukos-

aminoglykanen ist, vom Substrat abgelöst werden (35), während die normalen Zellen weiterhin anhaften.

Viele Zelltypen sind von einer hyaluronathaltigen perizellulären Hülle umgeben. Sie stellt für die Zellen hauptsächlich einen Schutz gegen Infektionen durch Viren dar (36,37). Neben dem zellulär gebundenen Hyaluronat findet man in dieser Hülle auch freies, sekretiertes Hyaluronat, welches in Wechselwirkung mit Proteoglykanen und Fibronektin tritt (38,39). Fibronektin ist das zentrale Molekül bei der Organisation der extrazellulären Hülle und besitzt Bindungsstellen sowohl für Kollagen als auch für Heparansulfat und Hyaluronat. Die Aggregation von Fibronektin und Kollagen wird antagonistisch durch Heparansulfat und Hyaluronat beeinflusst, wobei Hyaluronat die Aggregation hemmt, während Heparansulfat sie fördert (40). Daher spielen die Glukosaminoglykane eine wichtige Rolle bei der fibronectin-abhängigen Adhäsion von Zellen an eine Kollagenmatrix.

Ein gut untersuchtes Modell, den Einfluß der perizellulären Hülle auf Zell-Zell Kontakte, Infektionen und Tumorgenese zu untersuchen, stellt die Mäusefibroblastenzelllinie 3T3 und ihre Simian Virus 40 transformierte Variante SV3T3 dar. Während die 3T3-Zellen eine hyaluronathaltige Hülle besitzen, konnte bei den SV3T3-Zellen diese nicht nachgewiesen werden (41). Trotzdem besitzen die transformierten Zellen zellgebundenes Hyaluronat. Gibt man exogenes Hyaluronat zu beiden Zelltypen, dann binden SV3T3-Zellen dieses mit höherer Affinität als die normalen Zellen. Die Bindungskapazität kann durch vorangegangene Hyaluronidasebehandlung noch erhöht werden, wodurch die perizelluläre Hülle der 3T3-Zellen vollständig zerstört wird. Im Gegensatz zu den 3T3-Zellen kann das zellgebundene Hyaluronat von SV3T3-Zellen durch exogen zugegebenes verdrängt werden (42).

Aufgrund dieser Tatsache wurde ein spezifischer Rezeptor für Hyaluronat postuliert, der mittlerweile als 85 kd Protein identifiziert und charakterisiert worden ist (43). Weitere Untersuchungen zeigten, daß bei den transformierten Zellen eine spontane, von divalenten Kationen unabhängige

Aggregation sowohl durch Hyaluronidase als auch durch exogen zugegebenes Hyaluronat verhindert werden konnte (43). Dadurch kommt dem Hyaluronatrezeptor eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von Zell-Zell Kontakten zu, die durch gebundenes Hyaluronat beeinflusst werden (44).

Bei den 3T3-Zellen werden zwei Bindungsstellen für exogenes Hyaluronat postuliert:

- a) Eine in der perizellulären Hülle mit niedriger Affinität (45).
- b) Eine membranständige mit hoher Affinität. Die Anzahl dieser Bindungsstellen ist aber weitaus niedriger als bei SV3T3-Zellen (45).

Die Bindung des zellgebundenen Hyaluronats bei den 3T3-Zellen ist dagegen weiterhin unbekannt.

Krankheiten

Viele Krankheiten sind mit einer veränderten Hyaluronat-synthese verbunden. Zusätzlich dazu konnte bei verschiedenen Entzündungen und Infektionen eine Veränderung des Molekulargewichts festgestellt werden. In Fibroblasten von entzündetem Zahnfleisch konnte keine erhöhte Hyaluronatsynthese gefunden werden. Jedoch erhöht sich die Einbaurate von $^3\text{H-GlcN}$ des in das Medium sekretierten Hyaluronats gegenüber der Kontrolle. Es zeigte sich, daß dieser offensichtliche Widerspruch auf eine Erhöhung des Molekulargewichts des sekretierten Hyaluronats bei den Zellen aus dem entzündetem Gewebe zurückzuführen ist (46).

Eine erhöhte Hyaluronatsynthese findet man bei vielen Krankheitsbildern, wie beim Marfansyndrom (47), bei Patienten mit Osteogenesis Imperfekta (48) oder bei Lungenemphysem (49).

Zudem spielt Hyaluronat bei der Tumorgenese eine wichtige

Rolle . So ist die Hyaluronatkonzentration zwischen den Tumorzellen und dem Nachbargewebe stark erhöht, wodurch, ähnlich wie bei der Embryogenese, das Eindringen des Tumors erleichtert wird (50,51). In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß nach einer Transformation von Zellen die Syntheserate extrem ansteigt (52-57). Viele dieser Tumorzellen bilden ähnlich wie die 3T3-Zellen eine hyaluronathaltige perizelluläre Hülle, die diese vor zytotoxisch wirkenden Lymphozyten schützt (58).

Hyaluronat ist eine wichtige Komponente der Synovialflüssigkeit. Mit einer Konzentration von 1.45 - 3.12 g/l und einem Molekulargewicht von $1.6 - 10.9 \times 10^6$ wirkt es in der Flüssigkeit als Gleitmittel und zur Stoßdämpfung. Die Viskosität dieser Flüssigkeit ist bei Patienten mit rheumatischer Arthritis erniedrigt. Obwohl die Gesamtmenge an synthetisiertem Hyaluronat während der Entzündung ansteigt (19), nimmt die Konzentration, bedingt durch eine Volumenzunahme der Synovialflüssigkeit, beträchtlich ab (59). Gleichzeitig steigt im Serum die Hyaluronatkonzentration der Patienten an (60). Die Abnahme der Viskosität der Synovialflüssigkeit wird meist auf ein niedrigeres durchschnittliches Molekulargewicht des Hyaluronats zurückgeführt. In vitro Untersuchungen zeigten, daß durch freie Radikale eine Depolymerisation der Ketten herbeigeführt werden kann (61). Obwohl kein direkter Hinweis auf eine Degradierung durch Radikale in der Flüssigkeit besteht, nimmt man an, daß durch polymorphonukleare Leukozyten verstärkt Radikale gebildet werden, die die Hyaluronatketten abbauen (62). Diese Hypothese wird zudem dadurch unterstützt, daß extrazelluläre Flüssigkeiten sehr niedrige Aktivitäten von Superoxiddismutase und Katalase besitzen (63).

Neuere Arbeiten von Dahl et al. (64) weisen jedoch darauf hin, daß zwar das mittlere Molekulargewicht bei rheumatischer Arthritis kleiner als bei gesunden Gelenkflüssigkeiten ist, dagegen aber der Anteil der hochmolekularen Moleküle im pathologischen Zustand höher als im gesunden Zustand ist. Sie führen den mit der Krankheit einhergehenden Verlust der

Viskosität der Synovialflüssigkeit daher nicht auf eine Degradierung des Hyaluronats zurück, sondern nur auf dessen verminderte Konzentration.

Biosynthese des Hyaluronats

Ein entscheidender Beitrag zur Aufklärung der Biosynthese des Hyaluronats gelang 1958 Glaser und Brown (65). Sie konnten als erste zeigen, daß die Kette in einem zellfreien System aus UDP-GlcA und UDP-GlcNAc synthetisiert wird. Gleiches konnte bald darauffolgend auch für Streptokokken bewiesen werden (66). Weitergehende Untersuchungen zeigten, daß der Ort der Hyaluronatsynthese bei Streptokokken in der Protoblastenmembran lokalisiert ist (67). Trotzdem dauerte es noch mehr als 20 Jahre, bis bewiesen werden konnte, daß in eukaryotischen Systemen das Enzym ebenfalls in der Plasmamembran verankert ist (68,69). Entsprechend den anderen Glukosaminoglykanen galt der Golgiapparat lange Zeit als Ort der Synthese (70). Hinweise dafür, daß diese Annahme falsch und damit die Hyaluronatsynthese völlig verschieden zur Proteoglykansynthese ist, ergaben sich daraus, daß Hyaluronat keinen postsynthetischen Modifikationen unterworfen ist, wie N- oder O-Sulfatierung, N-Deacetylierung oder Epimerisierung, die alle im Golgiapparat stattfinden. Die letzten Zweifel konnten beseitigt werden, als gefunden wurde, daß Monensin, das die Sekretion von Golgivesikeln blockiert, auf die Syntheserate keinen Einfluß ausübt (71), während die Synthese von Chondroitinsulfat Proteoglykan inhibiert wird. Die Möglichkeit von Lipidzwischenstufen konnte durch Zugabe von Tunicamycin, das die Neubildung der Dolicholphosphatvorläufer verhindert, ausgeschlossen werden (72,73).

Ob Hyaluronat an ein 'Core-Protein' gebunden ist, war lange Zeit diskutiert worden, bis Fraser und Baxter (74) zeigten, daß in Fällen, in denen ³H-Leucin markierte Proteine bei einer extensiven Hyaluronatextraktion mitgereinigt wurden (75), die radioaktive Markierung von Leucin

als Acetat in N-Acetylglukosamin der Hyaluronatkette eingebaut war.

Die letzte Ähnlichkeit der Biosynthese zwischen Hyaluronat und den Glukosaminoglykanen der Proteoglykane konnte von Prehm ausgeschlossen werden (76,77). Er zeigte, daß die Kettenverlängerung durch alternierende Übertragung der Substrate auf das reduzierende Ende stattfindet, nachdem bis dahin die Übertragung auf das nicht-reduzierende Ende postuliert worden war (78). Das heute allgemein akzeptierte Modell der Hyaluronatsynthese ist in Abb. 3 dargestellt.

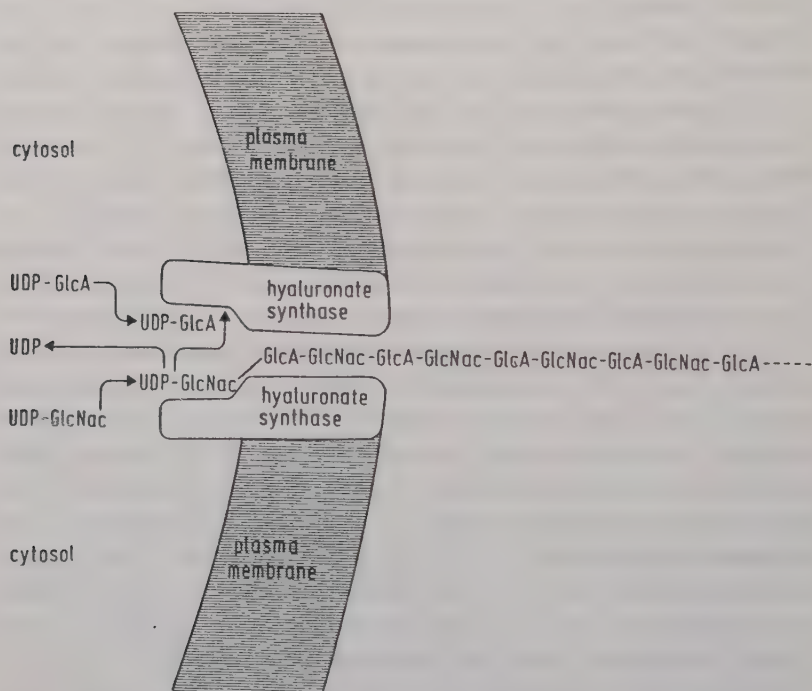


Abb. 3: Hyaluronat wird an der Innenseite der Plasmamembran synthetisiert und in den extrazellulären Raum geschleust.

1986 wurde die Identifizierung der Hyaluronatsynthase von zwei Arbeitsgruppen beschrieben. Mian (79,80) beschrieb ein 442 kd Protein aus Eukaryonten, das aus einer 200 kd und zwei 121 kd Einheiten besteht. Zum andern war das Enzym als ein 52 kd Protein aus Streptokokken charakterisiert worden (81). Proteinsequenzen des 52 kd Proteins ergaben jedoch eine starke Homologie zu Enolase, so daß mittlerweile als gesichert gelten kann, daß dieses nicht die Hyaluronatsynthase ist.

Ob der von Mian beschriebene Komplex das Enzym darstellt, kann in nächster Zukunft sicherlich geklärt werden, da es Triscott und van de Rijn (4) gelang, das Enzym in Digitonin zu solubilisieren und die Aktivität in Phospholipidvesikeln zu rekonstituieren.

Regulation der Biosynthese

Über den Mechanismus der Kontrolle der Hyaluronatsyntheserate ist wenig bekannt. Sowohl in Zellkultur als auch bei in vitro Untersuchungen an Plasmamembranen sind viele Faktoren gefunden worden, die auf das Enzym einen aktivierenden oder inhibierenden Effekt ausüben. Jedoch konnte in den meisten Fällen nicht bestimmt werden, ob ein direkter Einfluß auf die Hyaluronatsynthase besteht, oder ob dies nur eine sekundäre Reaktion auf andere zelluläre Prozesse darstellt.

Zwischen der Multiplikationsrate von Zellen und der Hyaluronatsynthese besteht eine direkte Korrelation (82). So konnte nachgewiesen werden, daß Faktoren, die das Zellwachstum beeinflussen, wie Insulin oder Cortisol (83), steigende Serumkonzentration (84), Wachstumsfaktoren, wie EGF (85) oder CDGF (86) oder Vitamin A (87), auch auf die Hyaluronatsyntheserate einwirken.

Die Aktivierung durch Interleukin I (88), c-AMP und andere Nukleotide (89), sulfatierten Glukosaminoglykanen (90) oder durch die Einwirkung von Tumorzellen auf Fibro-

blasten (91) bleibt bis heute unverstanden.

Kettenlänge des Hyaluronats

In engem Zusammenhang mit der Regulation der Hyaluronat-syntheserate steht die Determination des Molekulargewichts der Kette und deren Sekretion in den extrazellulären Raum. Ob ein Zusammenhang zwischen der Hyaluronatsyntheseaktivität und der Kettenlänge besteht, sollte in der folgenden Arbeit untersucht werden.

Das Molekulargewicht des Hyaluronats aus verschiedenen Geweben variiert, je nach Herkunft, beträchtlich (7×10^4 - 1.4×10^7) (92). Aus einer Reihe von Untersuchungen an verschiedenen Systemen geht hervor, daß die Größe der Kette nicht statistisch, sondern biologisch bestimmt ist:

- a) Während der Embryonalentwicklung verändert sich die Kettenlänge. Im prächondrogenen Extremitätenknospen synthetisieren die Zellen ein höheres Molekulargewicht als im chondrogenen Gewebe (93).
- b) Bei der Chondrogenese in Somiten nimmt die Hyaluronatmenge ab, während die Kettenlänge zunimmt (94).
- c) Die Stimulierung der Differenzierung von Chondrozyten durch Hyaluronat als Substrat, ist abhängig von dessen Molekulargewicht (95).
- d) Fibroblasten aus chronisch entzündetem Zahnfleisch synthetisieren ein höheres Molekulargewicht als normale Zellen (46).
- e) Die Affinität des Hyaluronatrezeptors aus Leberendothelzellen ist abhängig vom Molekulargewicht des Hyaluronats (96).

f) Bindungsstudien mit SV3T3-Zellen ergaben ebenfalls, daß die Affinität des Rezeptors zu Hyaluronat von dessen Molekulargewicht abhängig ist (97).

Trotz all dieser Ergebnisse blieb es bis heute unbekannt, wie die Kettenlänge bestimmt und reguliert wird.

B. AUFGABENSTELLUNG

Hyaluronat ist ein wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix. Neben deren Struktur beeinflusst sie maßgeblich Zellwanderung und Differenzierung. Über die Regulation der Synthese und den Transport des Hyaluronats in den extrazellulären Raum ist jedoch noch sehr wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es daher, den Abspaltungsmechanismus aufzuklären. Hierzu sollten im einzelnen folgende Schritte durchgeführt werden:

- 1.) Bestimmung der Kettenlänge verschiedener Zelllinien unter normalen Kulturbedingungen.
- 2.) Abhängigkeit der Kettenlänge von Radikalen.
- 3.) Abhängigkeit der Kettenlänge vom Zellzyklus.
- 4.) Beeinflussung der Aktivität der Hyaluronatsynthese und deren Zusammenhang mit der Kettenlänge.
- 5.) Isolierung des aktiven, reinen Proteins, um bestimmen zu können, ob zur Abspaltung des Hyaluronats ein zweites, unabhängiges Protein nötig ist.
- 6.) Im Laufe der Arbeit zeigte sich, daß die Hyaluronatsyntheserate während der Mitose stark erhöht war. Daraus ergaben sich neue Fragen über den Einfluß von Hyaluronat auf die Zellteilung.

Aus diesen Ergebnissen sollte sich ein genaues Bild des Mechanismus der Hyaluronatsynthese ergeben und Rückschlüsse auf den Abspaltungsmechanismus erlauben.

C. ERGEBNISSE

I. Untersuchungen zum Kettenabbruch und Aktivitäten in vivo

1. Bestimmung der Kettenlänge bei verschiedenen Zelllinien

Der Mechanismus des Kettenabbruchs ist nur verständlich, wenn der Einfluß der Hyaluronatsynthese auf die Längenverteilung des Hyaluronats bekannt ist. Veränderungen des Molekulargewichts können entscheidende Hinweise auf diesen Mechanismus liefern. Deshalb beschäftigt sich der erste Teil dieser Arbeit mit der Abhängigkeit der Kettenlänge von Kulturbedingungen und externen Faktoren. Als Modellsysteme wurden zum einen Streptokokken als prokaryotisches Modell, zum andern Zelllinien, die sich in Herkunft und Transformation unterschieden, herangezogen.

Die Untersuchung der Kettenlänge des zellulären und extrazellulären Hyaluronats unter 'Normalbedingungen' diente bei späteren Experimenten als Kontrolle. Die grundlegenden Methoden der in vivo Bestimmung werden im nachfolgenden genauer dargestellt, da sie für weitergehende, später beschriebene Versuche von Bedeutung sind.

1.1 Kettenlänge von Streptokokken

Streptokokken (Stamm D 181, Gruppe C) wurden als Modell herangezogen, da sie eine Kapsel produzieren, die ausschließlich aus Hyaluronat besteht. Ein weiterer Vorteil ist, daß die Syntheseleistung wesentlich höher als bei eukaryotischen Zelllinien ist und sie leicht in großen Mengen kultivierbar sind.

Zur Bestimmung der Kettenlänge wurde eine logarithmisch wachsende Kultur mit ^3H -Glukosamin (^3H -GlcN) inkubiert. Aus dem Kulturmedium wurde das Molekulargewicht des extrazellu-

lären Hyaluronats ermittelt. Dieses wurde mit 5 Volumeneinheiten 70% Ethanol gefällt und über Nacht mit Protease verdaut, wodurch ihr Molekulargewicht nicht beeinflusst wird (68). Die Größenverteilung wurde mittels Gelfiltration auf Sephacryl S-1000 bestimmt.

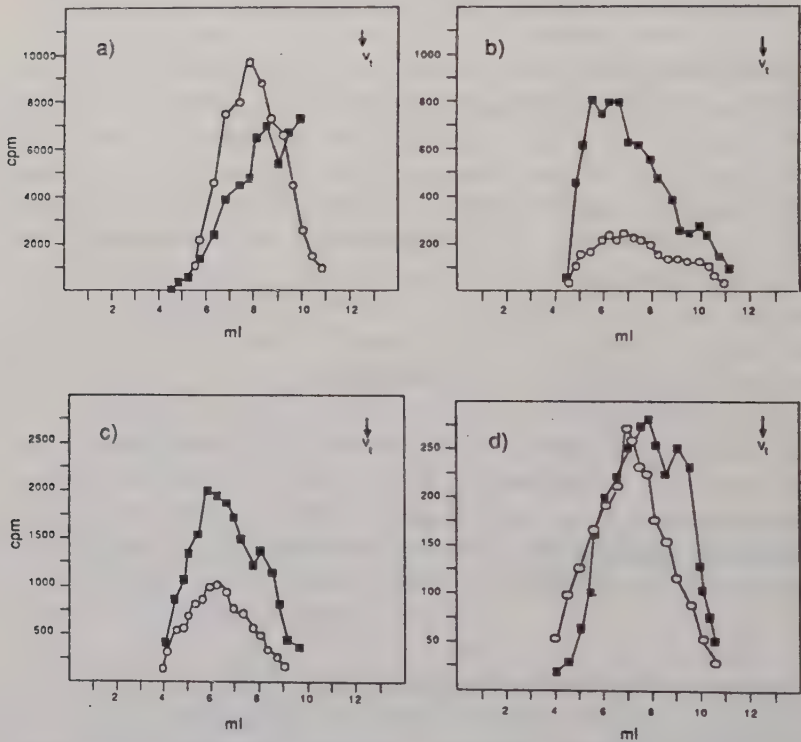


Abb. 4: Bestimmung der Größenverteilung des mit ^3H -GlcN markierten zellulären (O) und extrazellulären (■) Hyaluronats durch Gelfiltration auf Sephacryl S-1000
a) Streptokokken, b) B6-Zellen,
c) SV3T3-Zellen, d) HE-Zellen
 V_t = Ausschlußvolumen.

Die Bestimmung des zellulär gebundenen Hyaluronats erfolgte aus dem Bakterienpellet. Dieses wurde so lange mit 1% Triton X-100 in PBS behandelt, bis sich die Kapsel löste.

Dieses ließ sich leicht durch Anfärben mit Tusche überprüfen, da die aus Hyaluronat bestehende Kapsel Rußpartikel ausschließt. Die Bakterien wurden danach abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde das zellulär gebundene Hyaluronat von Proteinen und Lipiden durch Extraktion mit Chloroform/Isoamylalkohol (5:1, V/V) abgetrennt (98). Die wässrige Oberphase wurde 24 Stunden gegen Wasser dialysiert. Aus dieser Lösung wurde die Größenverteilung des zellulären Hyaluronats bestimmt.

Das extrazelluläre Hyaluronat zeigt im Gegensatz zum zellulär gebundenen Hyaluronat keine scharf abgetrennten Molekulargewichte, sondern geht übergangslos in den Salzpeak über (Abb. 4a). Dieser Befund läßt sich dadurch erklären, daß eine Degradierung des extrazellulären Hyaluronats erfolgt. Van de Rijn führte (99) dies zurück auf eine hyaluronidase-ähnliche Aktivität, die mit der Membran assoziiert ist und unter denaturierenden Bedingungen verloren geht.

1.1.1 Bestimmung des Molekulargewichts von Hyaluronat aus Streptokokken durch Viskositätsmessung

Da Streptokokken im Gegensatz zu den eukaryotischen Zelllinien die höchste Hyaluronatsynthaseaktivität besitzen, wurde bei ihnen das relative Molekulargewicht ermittelt. Dieses sollte einen Anhaltspunkt darüber geben, welche Molekulargewichte auf einer Sephacryl S-1000 Säule trennbar und unterscheidbar sind. Die mittlere Größe des Hyaluronats wurde dabei über die reduzierte Viskositätszahl bestimmt (100).

Dazu wurde eine logarithmisch wachsende 200 ml Kultur wie unter C.I.1.1 beschrieben, aufgearbeitet. Die Konzentration des zellulären und extrazellulären Hyaluronats wurde in verschiedenen Verdünnungen nach der Methode von Bitter und Muir (101) bestimmt. Aus der ermittelten Hyaluronatkonzentration und der spezifischen Viskosität läßt sich die reduzierte

Viskositätszahl berechnen.

Zur Durchführung der viskosimetrischen Messungen wurde ein 1 ml Kapillar-Viskosimeter verwendet, wobei die Laufzeit der Proben bzw. des benutzten Lösungsmittels bei 25°C bestimmt wurden. Als Proben wurden die gleichen Verdünnungen der Hyaluronatlösungen verwendet, aus denen auch der Glukosaminogehalt bestimmt worden war.

Die relative Viskosität ergibt sich dabei nach dem Verhältnis der Laufzeit der Probe zum verwendeten Lösungsmittel:

$$\frac{\text{durchschnittliche Laufzeit der Probe}}{\text{durchschnittliche Laufzeit von PBS}} = \text{relative Viskosität}$$

Daraus leitet sich die spezifische Viskosität ab:

$$\text{relative Viskosität} - 1 = \text{spezifische Viskosität}$$

Woraus die reduzierte Viskosität folgt nach:

$$\frac{\text{spezifische Viskosität} \times 10^6}{\text{Hyaluronatkonzentration}} = \text{reduzierte Viskosität}$$

Trägt man nun die reduzierte Viskosität gegen die Hyaluronatkonzentration der jeweiligen Verdünnungsreihe gegeneinander auf, so erhält man eine Gerade, deren Schnittpunkt mit der Ordinate ein Maß für die intrinsische Viskosität darstellt (Abb. 5).

Aus der Streptokokkenkultur ließen sich so die aus Tabelle 1 ersichtlichen Werte ermitteln.

Aus einer Eich-tabelle (100) erhält man für das zellulär gebundene Hyaluronat ein mittleres Molekulargewicht von 3×10^6 , während für das extrazelluläre Hyaluronat nur ein Wert von 6×10^5 bestimmt wurde. Vergleicht man dieses Ergebnis

mit der unter C.I.1.1 erhaltenen Abb. 4a, so ist zu erkennen, daß solche Molekulargewichtsunterschiede leicht durch säulenchromatographische Methoden nachweisbar sind. Jedoch sind Unterschiede im Bereich von 10^5 kaum noch trennbar.

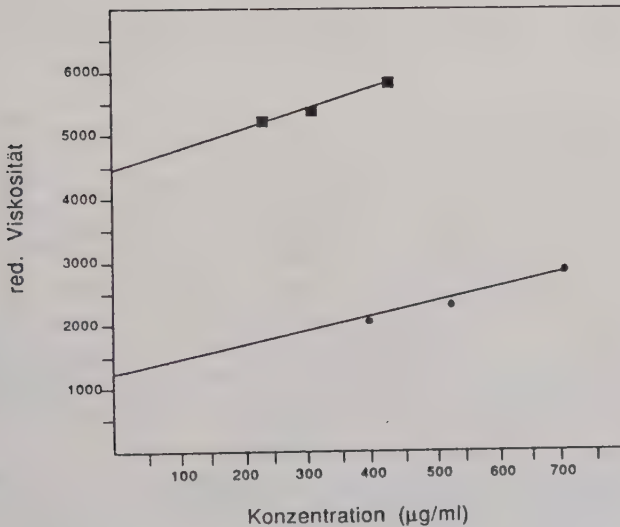


Abb. 5: Bestimmung der intrinsischen Viskositätszahl bei Streptokokken.

- (■) zellulär gebundenes Hyaluronat,
- (●) extrazelluläres Hyaluronat.

Verdün- nungen	Laufzeit in sek.	mg/l HA	relative Viskosi- tät	spezifische Viskosi- tät	reduzierte Viskosi- tät

PBS	100.55				

extrazel- luläre HA					
1	299.35	710	2.9771	1.9771	2784.6
0.75	224.8	527.5	2.2362	1.2362	2343.5
0.56	185	397.5	1.8401	0.8401	2113.5

zellu- läre HA					
1	352.14	427.5	3.5021	2.5021	5852.9
0.75	267.9	313	2.6643	1.6643	5317.3
0.56	224.5	234	2.2327	1.2327	5267.9

Tab. 1: Viskositäten des zellulären und extrazellulären Hyaluronats aus einer Streptokokkenkultur. (Beschreibung s. Text).

1.2 Kettenlänge des Hyaluronats in B6-Zellen

Neben den Streptokokken als prokaryotisches Modell wurde im Laufe der Arbeit überwiegend mit eukaryotischen Zelllinien gearbeitet. Verwendet wurde unter anderem die Hybridzelllinie B6, die aus der Fusion von C3H Zellen (aus dem Mammarkarzinom der Maus) und einer Zelllinie aus Lungengewebe chinesischer Hamster entstanden ist.

Die Folge davon ist, daß diese Zellen nicht mehr an einer festen Matrix anhaften. Der Vorteil dieser Zelllinie liegt in der für eukaryotische Systeme extrem hohen Hyaluronatsyntheserate. Sie synthetisieren 7 bzw. 50mal mehr Hyaluronat

als ihre Elternzellen (102).

Zur Bestimmung der Kettenlänge wurden die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert und mit $5 \mu\text{Ci } ^3\text{H-GlcN/ml}$ markiert. Die extrazelluläre Glukosaminoglykane wurden nach dem Abzentrifugieren der Zellen aus dem Medium mit Ethanol gefällt und über Nacht mit Protease verdaut. Die Abtrennung anderer Glukosaminoglykane von Hyaluronat erfolgte durch Ionenaustauscherchromatographie auf DEAE-Sephacel (103). Hyaluronat eluierte bei einem 0 - 0.6 M NaCl-Gradienten bei 0.36 M NaCl (Abb. 6). Die Fraktionen dieses Maximums wurden gesammelt und lyophilisiert. Die Größenbestimmung des synthetisierten Hyaluronats erfolgte durch Gelfiltration.

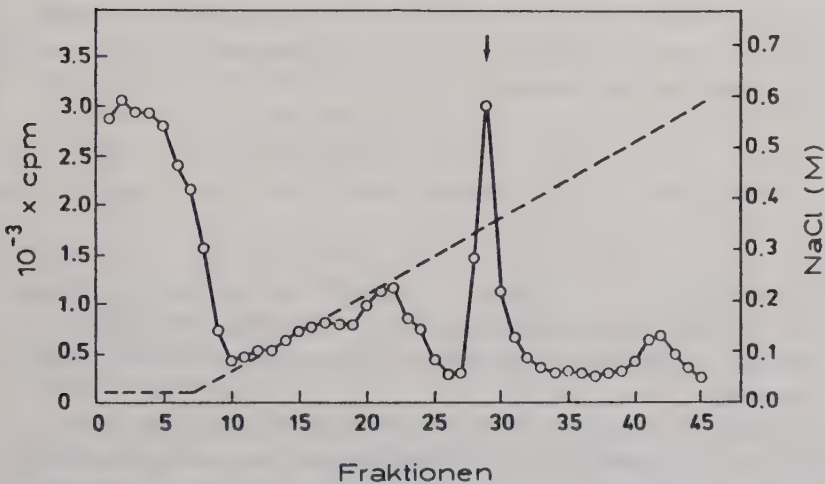


Abb. 6: Abtrennung der sulfatierten Glukosaminoglykane von Hyaluronat über Ionenaustauscherchromatographie an DEAE-Sephacel. Die Glukosaminglykanfraktion wurde entweder aus dem Medium oder aus lysierten B6-Zellen durch Fällung mit Ethanol erhalten. (Beschreibung s. Text). Die Elution erfolgte mit einem linearen Gradienten vom 0 - 0.6 M NaCl in 10 mM Tris pH 8.4, wobei Hyaluronat bei 0.36 M NaCl eluierte (Pfeil).

Zur Freisetzung des zellulär gebundenen Hyaluronats wurden die Zellen mit dem Detergenz Emulphogen (1% Endkonzentration) lysiert. Durch 5minütiges Erhitzen auf 100°C wurden Proteine denaturiert. Nach der Proteasebehandlung wurde das Hyaluronat anschließend entsprechend dem extrazellulären Hyaluronat isoliert und sein Molekulargewicht bestimmt.

Zwischen dem zellulären und extrazellulären Hyaluronat besteht kein Größenunterschied (Abb. 4b). Das Maximum des Elutionsprofils wird bei dem extrazellulären Hyaluronat bereits nach 5 ml erreicht, während dies bei dem zellulär gebundenen erst nach 6 ml der Fall ist. Dies ist damit zu erklären, daß der Anteil der neusynthetisierten, noch etwas kürzeren Ketten gegenüber den hochmolekularen Ketten an der Zellmembran überwiegt. Die Tatsache, daß keine niedermolekularen Ketten gefunden werden konnten, kann darauf zurückzuführen sein, daß ihre radioaktive Markierung zu gering ist, um noch nachgewiesen werden zu können.

1.2.1 Änderung des Kettenwachstums bei B6-Zellen nach Hyaluronidasebehandlung

Um die Frage zu klären, wie lange die Zellen benötigen, um diese Kettenlänge herzustellen, wurde bei B6-Zellen das zellulär gebundene Hyaluronat mit *Streptomyces* Hyaluronidase entfernt.

Danach wurden die Zellen mit ^3H -GlcN inkubiert, nach 10, 20, 40, 70 Minuten, 2, 4, 6, 8 Stunden geerntet und das Hyaluronat isoliert. Die nachfolgenden Gelfiltrationen zeigten, daß die Kette an der Zellmembran kontinuierlich wächst und bereits nach 2 Stunden die in Abb. 4b dargestellte Größe erreicht wird. Im Unterschied dazu konnte Hyaluronat der entsprechenden Größe erst nach 4 Stunden im Medium nachgewiesen werden. Dies beweist, daß die Zellen die Ketten bis zu einer bestimmten Größe verlängern, um sie danach in den extrazellulären Raum abzugeben.

1.3 Kettenlänge des Hyaluronats von SV3T3-Zellen

Als weiteres Zellsystem wurden SV3T3-Zellen zur Untersuchung herangezogen. Diese entstehen aus 3T3-Zellen durch Transformation mit Simian Virus 40.

Orkin et al. (104) haben bereits früher gezeigt, daß 3T3-Zellen eine aus Hyaluronat bestehende perizelluläre Hülle besitzen, SV3T3-Zellen dagegen nicht. Trotzdem synthetisieren diese Hyaluronat, das sowohl zellulär als auch extrazellulär nachgewiesen werden kann. Daher war es interessant, die Frage zu klären, ob durch Transformation, die mit dem Verlust der perizellulären Hülle gekoppelt ist, das Molekulargewicht einen deutlichen Unterschied gegenüber dem Hyaluronat aus den nichttransformierten Zellen aufweist.

Die Kultivierung der Zellen und die Isolierung des Hyaluronats erfolgte wie unter C.I.1.2 beschrieben.

Auch bei diesem Zelltyp sind die Molekulargewichte des extrazellulären und zellgebundenen Hyaluronats gleich. Das Elutionsmaximum ist ähnlich wie bei den B6-Zellen, jedoch ist das Molekulargewicht nicht so heterogen (Abb. 4c).

1.4 Kettenlänge des Hyaluronats in HE-Zellen

HE-Zellen sind menschliche embryonale Hautfibroblasten und zeichnen sich durch ihre spindelförmige, bipolare Morphologie aus.

Die Kettenlängen des extrazellulären und zellgebundenen Hyaluronats, die sich nach Aufarbeitung entsprechend C.I.1.2 ergaben, unterscheiden sich nicht und gleichen dem Hyaluronat aus SV3T3- und B6-Zellen (Abb. 4d).

Die Größenverteilung änderte sich auch nicht, wenn man die Zellen 5 Tage im konfluenten Zustand unter Zusatz von $^3\text{H-GlcN}$ kultivierte. Damit wurde bewiesen, daß die Zellen im stationären Zustand gleiche Kettenlängen synthetisieren wie in der Wachstumsphase.

Insgesamt wurden zwei Gruppen von Zelllinien für die Versuche herangezogen. Von Tumorzelllinien wurden neben den hier beschriebenen B6- und SV3T3-Zellen zusätzlich noch die Humane Fibrosarcomlinie HT 1080 auf die Größenverteilung des Hyaluronats untersucht. Als Beispiele für normale Zellen wurden 3T3- und HE-Zellen benutzt. Es konnte in allen Fällen kein bedeutender Unterschied zwischen den einzelnen Zelllinien festgestellt werden.

Als Kontrolle, daß jeweils Hyaluronat isoliert und chromatographiert worden war, wurden die Proben mit Hyaluronidase behandelt. Bei der nachfolgenden Gelfiltration konnte Radioaktivität nur noch im eingeschlossenen Volumen gefunden werden.

2. Hyaluronatsynthaseaktivitäten der Zelllinien

Neben der Bestimmung der Kettenlänge war es unerlässlich auch die Enzymaktivitäten der untersuchten Zelllinien zu ermitteln. Um Kontrollmechanismen der Zelle auszuschalten wurden die Zellen durch Einfrieren und Auftauen lysiert, wodurch das Enzym für die Substratmoleküle UDP-GlcA und UDP-GlcNAc zugänglich wird. Aus diesen Meßwerten sind nur die Absolutwerte der Aktivitäten zu ersehen, weshalb nicht unterschieden werden kann, ob eine Zelllinie viel Hyaluronatsynthase mit wenig Aktivität oder wenig Hyaluronatsynthase mit hoher Aktivität besitzt. Diese Methode zur Ermittlung der Enzymaktivität wurde immer dann angewandt, wenn schnell und einfach die Hyaluronatsynthaseaktivität von unterschiedlich behandelten Zellen bestimmt werden sollte.

Die Zellen wurden nach dem Lysieren mit markiertem Substrat 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Dabei ergab sich folgende Aktivitätsabstufung :

HE > B6 > 3T3 > SV3T3 > HT-1080

Tabelle 2 zeigt, daß die Synthaseaktivität bei den einzelnen Zelllinien sehr unterschiedlich ist. So synthetisieren HE-Zellen etwa die doppelte Menge Hyaluronat im Vergleich zu B6-Zellen, bzw. 10mal mehr als HT 1080-Zellen, die von den untersuchten Zellen am wenigsten Hyaluronat synthetisieren.

Zelltyp	cpm/10 ⁶ Zellen x 30 Min.
HE	13535
B6	7283
3T3	2092
SV3T3	1508
HT 1080	1284

Tab. 2: Hyaluronatsynthaseaktivität verschiedener Zelllinien. Die Zellen wurden von der Kulturschale abgeschabt, lysiert und mit UDP-¹⁴C-GlcA markiertem Substrat inkubiert.

Die Messung der Syntheserate über die Menge an eingebautem Substrat erlaubt jedoch keine Aussage über die Kettenlänge, sondern stellt ein Maß für die Aktivität des Enzyms dar. Aus diesem Experiment konnte in späteren Versuchen die Aktivität der Synthase auf die Proteinmenge bezogen werden.

2.1 Einfluß von Hyaluronidase und Trypsin auf die Aktivität

Um entscheiden zu können, ob die Enzymaktivität durch gebundenes Hyaluronat beeinflusst wird, wurde bei B6-Zellen zellulär gebundenes Hyaluronat durch Behandlung mit Hyaluronidase entfernt. Danach wurde die Enzymaktivität der Zellen ermittelt. Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen ergab sich eine Erhöhung der Einbaurate von ¹⁴C-GlcA um 45% (Tab. 3).

	cpm/10 ⁶ Zellen x Std.		
	SV3T3	3T3	B6
Hyaluronidase behandelt	13264	8506	23000
Trypsin behandelt	5792	5700	
abgeschabte Zellen	1244	4988	
abzentrifu- gierte Zellen			15863

Tab. 3: Hyaluronatsynthaseaktivität von verschiedenen behandelten Zellen.
Die Zellen wurden lysiert und mit UDP-¹⁴C-GlcA markiertem Substrat inkubiert.

Genauer kann der Einfluß des zellgebundenen Hyaluronats auf die Enzymaktivität mit den Zelllinien 3T3 und ihren SV40 transformierten Varianten untersucht werden. 3T3-Zellen besitzen eine perizelluläre Hülle, die jedoch den SV3T3-Zellen fehlt. Bindungsstudien ergaben andererseits, daß 3T3-Zellen sehr viel weniger Hyaluronatrezeptoren besitzen als transformierte SV3T3-Zellen. Aus diesen Zellen konnte der Rezeptor isoliert und genauer charakterisiert werden (41-43, 105, 106). Da beide Zellen auf einer festen Matrix wachsen, kann der Einfluß der perizellulären Hülle und des Hyaluronatrezeptor auf die Hyaluronatsynthase dadurch untersucht werden, daß die Zellen auf unterschiedliche Weise von der Matrix abgelöst werden.

Die beiden Zelllinien wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend folgendermaßen behandelt:

- a) Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem Gummiwischer von der Matrix abgeschabt, wobei das zellulär gebundene Hyaluronat und die perizelluläre Hülle erhalten bleiben.
- b) Die Zellen wurden abgeschabt und danach mit Hyaluronidase behandelt, wodurch sowohl die perizelluläre Hülle als auch das zellgebundene Hyaluronat entfernt werden (41,104).
- c) Die Zellen wurden trypsiniert, wodurch der an der Zelloberfläche lokalisierte Hyaluronatrezeptor der SV3T3-Zellen zerstört wird (107), während die perizelluläre Hülle der 3T3-Zellen erhalten bleibt.

Bei den verschieden behandelten Zellen wurde anschließend die Enzymaktivität bestimmt.

Wie bei den B6-Zellen stieg die Syntheserate nach der Hyaluronidasebehandlung gegenüber den abgeschabten Zellen an. Dabei erhöhte sich die Enzymaktivität bei den 3T3-Zellen um etwa das Doppelte, während sich die Hyaluronidasebehandlung bei den SV3T3-Zellen mit einer 10fachen Erhöhung besonders drastisch auswirkte (Tab. 3). Setzt man dieses Ergebnis in Beziehung zu der Menge an Rezeptoren, die beide Zelllinien besitzen, so liegt der Schluß nahe, daß die Enzymaktivität durch den Hyaluronatrezeptor reguliert wird. Die Syntheserate könnte gesteigert werden, wenn freie Bindungskapazitäten vorhanden sind oder erniedrigt werden, wenn sie besetzt sind. Da SV3T3-Zellen mehr Rezeptoren als ihre nicht-transformierte Variante besitzen, kann bei ihnen die Enzymaktivität stärker ansteigen als bei den 3T3-Zellen. Sehr wahrscheinlich ist auch die im Vergleich zu den 3T3-Zellen etwa 5fach niedrigere Enzymaktivität der SV3T3-Zellen im Kontrollversuch darauf zurückzuführen, daß beim Abschaben der Zellen das zellgebundene Hyaluronat nicht zerstört wird und somit der Rezeptor blockiert bleibt.

Wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, so entsprachen die dabei erhaltenen Enzymaktivitäten im wesentlichen der

Hypothese, die sich aus der Hyaluronidasebehandlung ergab. Nur bei den SV3T3-Zellen erhöhte sich die Syntheserate um etwa den 5fachen Wert, da durch die Trypsineinwirkung der Rezeptor zerstört und dadurch ein Zustand erreicht wird, der dem unblockierten Rezeptor entspricht, also zu einer höheren Aktivität des Enzyms führt. Dagegen zeigten die 3T3-Zellen keine entscheidende Veränderung gegenüber der Kontrolle (Tab. 3), da die perizelluläre Hülle selbst nicht durch Trypsin zerstört wird. Daß die Enzymaktivität der trypsin-behandelten SV3T3-Zellen nicht der nach Hyaluronidaseeinwirkung entspricht, kann zum einen dadurch erklärt werden, daß nicht alle Rezeptoren vollständig zerstört wurden, zum andern damit, daß die Trypsinierung auch andere zelluläre Funktionen beeinträchtigt.

2.2 Blockierung des Hyaluronatrezeptors bei SV3T3-Zellen mit Hyaluronat

Die in C.I.2.1 beschriebene Hypothese, daß über den Hyaluronatrezeptor die Aktivität des Enzyms reguliert wird, konnte in einem weiteren Versuch bestätigt werden. Dazu wurden SV3T3-Zellen mit Hyaluronidase behandelt und anschließend mit exogen zugegebenem Hyaluronat in steigender Konzentration, inkubiert.

Nachfolgendes Aufbrechen und Inkubieren der Zellen mit Substrat ergab, daß die Enzymaktivität mit zunehmender Hyaluronatkonzentration abnimmt (Tab. 4) und mit 6 µg Hyaluronat/100 µl Lösung der Kontrollwert von unbehandelten Zellen erreicht wird, was darauf hinweist, daß alle Rezeptoren blockiert sind, da über diesen Wert zugegebenes Hyaluronat keinen weiteren Einfluß mehr zeigt.

$\mu\text{g HA}/100 \mu\text{l}$	cpm/ 10^6 Zellen x Std.
0	610
3	428
6	286
9	140
120	240
Kontrolle	242

Tab. 4: Hemmung der Hyaluronatsynthase durch exogen zugegebenes Hyaluronat bei hyaluronidase-behandelten SV3T3-Zellen.

2.3 Kettenlänge des Hyaluronats bei SV3T3-Zellen nach Blockierung des Rezeptors mit Concanavalin A (Con A)

Da die Syntheseleistung von SV3T3-Zellen durch gebundenes Hyaluronat reguliert werden könnte, lag die Vermutung nahe, daß auch die Kettenlänge dadurch festgelegt wird. Zudem war aufgrund von Bindungsstudien festgestellt worden, daß die Affinität des Rezeptors vom Molekulargewicht des Hyaluronats abhängig ist (44).

Neben Hyaluronat bindet auch das Lectin Concanavalin A (Con A) an den Hyaluronatrezeptor von SV3T3-Zellen (44). Die Hypothese war, daß durch Con A der Rezeptor blockiert wird und sich dadurch die Größenverteilung des neu synthetisierten Hyaluronats entscheidend gegenüber den vorhergehenden Versuchen ändert.

Dazu wurden die Zellen mit Con A unter Zusatz von ^3H -GlcN inkubiert und wie unter C.I.1.1 beschrieben aufgearbeitet.

Bei den nachfolgenden Gelfiltrationen konnte jedoch kein Molekulargewichtsunterschied gegenüber der Kontrolle (Abb. 4c) festgestellt werden. Im Gegensatz dazu wurde die Enzymaktivität durch die Zugabe von Con A um 35% gegenüber dem Kontrollwert gesenkt. Der Hyaluronatrezeptor ist demnach nur

bei der Regulierung des Enzyms, nicht aber an der Bestimmung der Kettenlänge beteiligt.

3. Kettenlänge des Hyaluronats in Abhängigkeit von Radikalen

Auch Radikale könnten die Kettenlänge beeinflussen. Es ist bekannt, daß Radikale zelluläre Matrixkomponenten wie Hyaluronat oder Kollagen in Lösung degradieren können (108). In biologischen Systemen wird die toxische Aktivität von Sauerstoff auf seine reaktiven Spezies, das Superoxidradikal ($O_2^{\cdot -}$), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und das Hydroxylradikal ($\cdot OH$) zurückgeführt. Ein gut beschriebenes System liegt für die Synovialflüssigkeit vor. Ihre Viskosität wird in vitro durch Sauerstoffradikale reduziert, als Folge zunehmender Hyaluronatdepolymerisation. In den pathologischen Gelenkflüssigkeiten bei rheumatischer Arthritis konnte keine Hyaluronidaseaktivität nachgewiesen werden (62). Deshalb wird vermutet, daß Radikale eine wesentliche Rolle spielen. Eine radikalische Degradierung in vivo konnte jedoch noch nicht bewiesen werden.

Deshalb sollte untersucht werden, ob die Hyaluronatketten unspezifisch durch freie Radikale abgespalten werden. In der Plasmamembran können Radikale durch die assoziierten Enzyme Lipxygenase und Cyclooxygenase produziert werden (63).

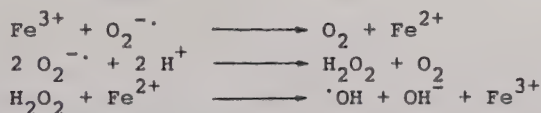
Es ist bekannt, daß Tumorzellen eine verminderte Superoxiddismutaseaktivität besitzen (109) und daher mehr freie Radikale produzieren. B6- und He-Zellen wurden deshalb mit den stark metastatisierenden B16F10-Melanoma-Zellen, die selbst kein Hyaluronat synthetisieren, kokultiviert. Falls ein Zusammenhang besteht, müßte das Molekulargewicht der mit diesen Tumorzellen kokultivierten Zellen erheblich kleiner werden.

Es konnte jedoch kein erkennbarer Unterschied bei den kokultivierten Zellen im Vergleich zu den Monokulturen festgestellt werden.

Ebenfalls veränderte sich die Kettenlänge von ^{14}C -markiertem Hyaluronat nicht, wenn es während der Kultivierung von SV3T3- oder B16F10-Zellen ins Medium zugegeben wurde.

Diese Ergebnisse kann man damit erklären, daß die Tumorzellen entweder keine verstärkte Radikalbildung aufweisen oder daß diese nicht zu einer weiteren Degradierung des Hyaluronats ausreichen bzw. der Abspaltungsmechanismus des Hyaluronats nicht auf einem Radikalmechanismus beruht.

Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden sowohl die einfach als auch die kokultivierten Zellen in Gegenwart von Radikalfängern kultiviert. Weder Tocopherolsuccinat (Vitamin E-Derivat) in der Konzentration von 1 - 12 $\mu\text{g/ml}$ Medium als Radikalfänger für $\text{O}_2^{\cdot-}$, $\text{ROO}^{\cdot}$ und $\text{OH}^{\cdot}$ (63), das aus dem Superoxidradikal nach der Haber-Weiß Reaktion nach Schema 1 gebildet wird, noch Mannitol als spezifischer Hydroxylradikalfänger (110) veränderten das Molekulargewicht des isolierten Hyaluronats.



Schema 1: Haber-Weiß Reaktion

Die unspezifische Degradierung der Hyaluronatketten durch Radikale bestätigte sich somit nicht. Sekundäreffekte, wie Scherkräfte oder Glukosidasen im Medium können jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

4. Hemmung der Proteinsynthese bei HE-Zellen

Über den Einfluß von Cycloheximid auf die Hyaluronatsynthese gibt es widersprüchliche Ergebnisse. Mapleson und Buchwald (111) beschreiben zum einen, daß Cycloheximid unter Bedingungen bei denen die Proteinsynthese zu 90% gehemmt

wird, keinen Einfluß auf die Hyaluronatsynthese ausübt und die Sekretion der Kette ins Medium normal erfolgt. Tomida et al. (102) zeigten jedoch, daß durch Cycloheximidbehandlung bei B6-Zellen neben der Proteinsynthese auch die Hyaluronatsyntheserate abnimmt und konnten daher, aufgrund der hohen 'Turnoverrate' des Enzyms dessen Halbwertszeit bestimmen. Bei Chondrozyten konnte ebenfalls eine rasche Abbaurrate des Enzyms nach Inhibition der Proteinsynthese festgestellt werden (112).

Um zu untersuchen, ob bei Hemmung der Proteinsynthese die Kettenlängen bei HE-Zellen verändert werden, wurden diese mit 10 µg Cycloheximid/ml Medium und ^3H -GlcN für 40 Stunden inkubiert. Nachfolgende Aufarbeitung und Gelfiltration ergab wieder die gleiche Größenverteilung wie in Abb. 4d. Gleichzeitig erniedrigte sich aber die Einbaurrate an Radioaktivität. Deshalb ist zur Erhaltung der Synthaseaktivität die Proteinbiosynthese erforderlich, die aber offensichtlich für die Kettenlänge des Hyaluronats ohne Bedeutung ist.

5. Abspaltung des Hyaluronats in Abhängigkeit vom Zellzyklus

Da die Hyaluronatsynthese mit vielen zellulären Funktionen, wie Wanderung (25) oder Adhäsion (34,113) in Beziehung steht, sollte die Frage untersucht werden, ob die Hyaluronatkette in einer spezifischen Phase des Zellzyklus abgegeben wird. Von einem anderen Glukosaminoglykan, Heparansulfat, ist bekannt, daß es spezifisch vor der Mitose am Ende der G_2 -Phase sekretiert wird (114). Außerdem haben Otto und Mühlradt (115) beschrieben, daß Glukosaminoglykane vorzugsweise nach der S-Phase im Zellzyklus synthetisiert und ausgeschieden werden.

5.1 Optimierung der Zellsynchronisation

Voraussetzung für die Durchführung der Versuche waren synchrone Zellpopulationen. In der Literatur werden einige Methoden zur Synchronisation beschrieben. Als geeignet erwiesen sich jedoch nur die spezifischen Hemmstoffe der einzelnen Stadien, wie Hydroxyharnstoff (Hemmung der DNA-Replikation), Colchicin (Hemmung der Metaphase während der Mitose) und Cytochalasin B (Hemmung der Cytokinese am Ende der Mitose).

Vorversuche ergaben, daß die durch Abklopfen von mitotischen Zellen erhaltene Zellzahl zu gering für die Messung der Hyaluronatsynthaseaktivität war, und daß das Trypsinieren von stationären Zellen eine geringe Synchronität ergab, da die Zellen unterschiedlich lange in der G_0 -Phase verharren.

5.2 Hemmung der DNA-Synthese bei HE-Zellen

Mit dem Hemmstoff Hydroxyharnstoff wird die DNA-Replikation (S-Phase) gehemmt, wodurch die Syntheserate jedoch nicht beeinträchtigt wird (102). Ob eine spezifische Abspaltung der Kette während der S-Phase stattfindet, wurde nach Inkubation von HE-Zellen mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Hydroxyharnstoff untersucht. Jedoch auch die Hemmung der DNA-Synthese veränderte die Kettenlänge nicht.

5.3 Hemmung der Mitose

Mit den Inhibitoren Colchicin und Cytochalasin B können die Zellen in der Mitose arretiert werden, wobei Colchicin durch Anlagerung an die Mikrotubuli in der Metaphase und Cytochalasin B durch Zerstörung der Aktinfilamente in der Cytokinese wirksam wird (116).

Die Konzentration für Colchicin mit 0.01 $\mu\text{g/ml}$ wurde so

gewählt, daß die Inhibition reversibel und nicht toxisch war (117). Höhere Konzentrationen führten dagegen zum Absterben der Zellen. Die Bestimmung der Kettenlängen führte zu dem Ergebnis, daß weder in der Metaphase noch in der Cytokinese Veränderungen gegenüber den unsynchronisierten Zellen bestehen.

Es zeigte sich aber, daß während der maximal 30 Minuten dauernden Zeitspanne zwischen den beiden Phasen die Syntheserate stark anstieg. Aus diesem Ergebnis ergaben sich Hinweise, daß Hyaluronat einen wesentlichen Einfluß auf das Abrunden und Ablösen der Zellen ausübt. Dies wird in Abschnitt C.III. genauer beschrieben.

6. Wird die Kettenlänge durch den 'Turnover' des Enzyms bestimmt?

Bei der Präparation von Plasmamembranen, sowohl von Streptokokken als auch von B6-Zellen, läßt sich Aktivität im Überstand nachweisen, wenn die darin befindlichen Proteine in Cardiolipinvesikel eingebaut werden, was bestätigt, daß es sich bei der Hyaluronatsynthese um ein membranständiges Enzym handelt (76).

Neben dem Abspaltungsmechanismus ist auch der Mechanismus des Ausschleusens der Kette aus der Zellmembran noch nicht bekannt. Deshalb bestand die Möglichkeit, daß die fertig synthetisierte Kette zusammen mit dem Enzym als ein Enzym-Hyaluronat-Komplex sekretiert wird. Dabei könnte das Enzym sowohl noch aktiv als auch inaktiv sein.

Zunächst war die Frage zu beantworten, ob im Inkubationsüberstand von Plasmamembranen nach vorhergehender Hyaluronatsynthese aktives Enzym nachgewiesen werden kann. Wird das aktive Enzym mit der Kette sekretiert, so sollte im Überstand von Membranen, die mit unmarkierter Substratlösung während einer Zeitkinetik vorher inkubiert worden waren, im nachfolgenden Enzymassay eine stete Zunahme an eingebauter Radioaktivität gemessen werden.

Dazu wurde die partikuläre Fraktion von B6-Zellen mit nicht-radioaktiv markiertem Substrat über verschiedene Zeitspannen inkubiert. Anschließend wurde in der partikulären Fraktion und im Überstand getrennt, die Enzymaktivität bestimmt. Während die Bestimmung der Hyaluronatsyntheserate in der partikulären Fraktion nach der üblichen Methode erfolgte, mußten die im Überstand befindlichen Proteine, wie vorher beschrieben, in Cardiolipinvesikel eingebaut werden. Damit Hyaluronat die Bildung dieser Vesikel nicht behindert, wurde der Überstand mit Hyaluronidase behandelt, um dieses zu degradieren. Die Liposomen wurden in wenig Natriumphosphatpuffer aufgenommen, mit Hyaluronat versetzt, um restliche Hyaluronidase zu hemmen, mit radioaktiv markiertem Substrat 1 Stunde inkubiert und die Einbaurate von ^{14}C -GlcA bestimmt.

Aus Tab. 5 ist zu entnehmen, daß im Überstand keine Zunahme der Hyaluronatsyntheserate mit zunehmender Inkubationsdauer nachgewiesen werden konnte

cpm/Std.						
Zeit (Min.)	Plasma- membran	Über- stand	Σ	Kontrolle		
				Plasma- membran	Über- stand	Σ -Kontrolle
30	13697	722	14419	11961	2886	14847
90	14379	514	14893	11361	2695	14056
150	12704	446	13150	10109	1848	11957
180	11395	482	11877	8929	1893	10822
300	9265	288	9553	6533	1022	7555
480	6870	168	7038	4344	847	5191

Tab. 5: Einbau von ^{14}C -GlcA in Hyaluronat von B6-Plasmamembranen und Überständen nach aktiver Synthese und ohne vorhergehende Synthese als Kontrolle. Die Zeit drückt die Vorinkubation mit kaltem Substrat aus. (Beschreibung s. Text).

Als Kontrolle wurden die Membranen zu Anfang mit magnesium-freiem Substrat versetzt, so daß keine Synthese stattfinden konnte. Im Gegensatz zum Experiment befand sich jedoch in diesem Kontrollversuch 20% der Enzymaktivität im Überstand (Tab. 5).

Dies entspricht der in weiteren Versuchen gewonnenen Erfahrung, daß die naszierende Hyaluronatkette das Enzym in der Plasmamembran stabilisiert.

Die Summe der eingebauten Radioaktivität aus partikulärer Fraktion und Überstand des Versuchs und des Kontroll-experiments ist gleich (Tab. 5). Daher kann ausgeschlossen werden, daß das aktive Enzym mit der Kette abgegeben wird.

Um jedoch die Möglichkeit mit einzubeziehen, daß es inaktiv ist und über den Enzymassay nicht mehr erfaßt werden kann, wurden B6-Zellen mit ^{35}S -Methionin und deren partikuläre Fraktion mit Na^{125}J markiert. Durch die Autoradiographie können kleine Proteinmengen nachgewiesen werden. Damit bestand die Möglichkeit, die als 52 kd charakterisierte Hyaluronatsynthase (81) im Medium bzw. im Überstand zu identifizieren.

Zum Markieren der Zellen in vivo wurden diese mit serum- und methionin-freiem Medium unter Zusatz von 150 μCi ^{35}S -Methionin 48 Stunden kultiviert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und das Medium dialysiert und lyophilisiert. Die Proteine wurden über SDS-PAGE-Elektrophorese aufgetrennt. Nach dem Trocknen des Gels konnten radioaktiv markierte Proteine auf einem Röntgenfilm erkannt werden. Dabei ergab sich jedoch kein eindeutiges Ergebnis, da mehrere Banden sichtbar waren, wovon keine zweifelsfrei dem 52 kd Protein zugeordnet werden konnte.

Um auszuschließen, daß das 52 kd Protein bei der Methioninmarkierung aufgrund zu geringer Mengen im Medium nicht nachgewiesen werden konnte, wurden B6-Membranen jodiert. Die Jodierung wurde nach einer Methode speziell für Proteine in Gegenwart eines Überschusses an Lipiden durchgeführt (118). Zuvor waren die Membranen 1 Stunde mit unmarkiertem Substrat inkubiert worden. Nach der Jodierung

wurde die Plasmamembran nochmals 1 Stunde mit Substrat inkubiert und anschließend der Überstand abgetrennt. Hyaluronat wurde dann mit 1% Cetylpyridiniumchlorid (Endkonzentration) unter Zugabe von 200 µg Hyaluronat als Carrier gefällt. Wird das Enzym mit der Kette herausgeschleust, so sollte es sich mit dem gefällten Hyaluronat im Niederschlag befinden. Das Proteinmuster der SDS-PAGE-Elektrophorese ergab das gleiche Resultat wie bei der Methioninmarkierung. Es konnten im CPC-Pellet mehrere Banden nachgewiesen werden, wovon wiederum keine der Hyaluronatsynthase zugeordnet werden konnte.

II. Untersuchungen der Kettenlängen und Aktivitäten in vitro

Die vorhergehend beschriebenen Versuche zeigten, daß die Größe des Hyaluronats bei Zellkulturen nicht beeinflußt werden konnte. Deshalb wurden die weiteren Experimente mit den isolierten Plasmamembranen der einzelnen Zelllinien durchgeführt. Es konnten auf diese Weise Substanzen getestet werden, die in vivo für die Zellmembran nicht durchlässig gewesen wären, während in vitro die Hyaluronatsynthase dafür zugänglich ist. Als erstes mußte jedoch geklärt werden, ob beide Systeme miteinander vergleichbar sind.

1. Kettenlänge des Hyaluronats bei B6-Membranen

Aus den B6-Zellen wurde nur deren partikuläre Fraktion isoliert, da eine Reinigung der Plasmamembran nach der Zweiphasenmethode (119) bisher nicht gelungen ist.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von radioaktiv markiertem Substrat gestartet, das aus den Vorläufermolekülen des Hyaluronats, UDP-GlcNAc und UDP-¹⁴C-GlcA, sowie Magnesium-Ionen als essentieller Cofaktor besteht. Die Reaktion wurde mit SDS (1% Endkonzentration) gestoppt. Die Größenverteilung des Hyaluronats, die nach 30minütiger und 1stündiger Inkubationszeit gemessen wurde, ist in Abb. 7 dargestellt. Die maximale Größe wird zwischen 45 und 60 Minuten erreicht, während längere Inkubationszeiten zu keiner Verlängerung der Hyaluronatkette führen. Dieser Versuch zeigt, daß auch an Membranen die Hyaluronatketten nur bis zu einer bestimmten Größe synthetisiert werden, um anschließend abgespalten zu werden. Daher ist die in vitro Synthese und Abspaltung direkt mit der in vivo Synthese vergleichbar.

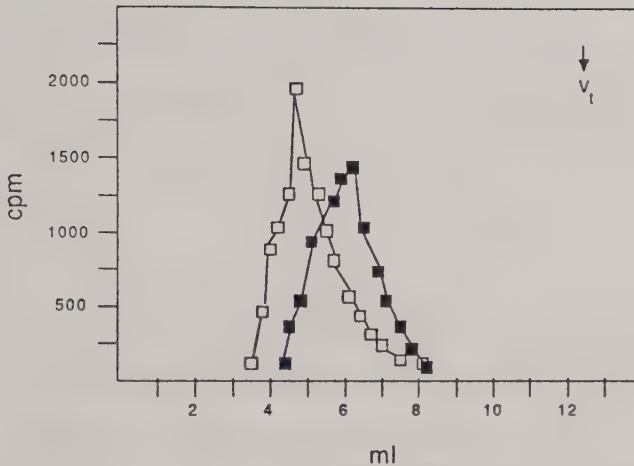


Abb. 7: Bestimmung der Größenverteilung des gesamten Hyaluronatgehalts aus B6-Membranen nach 30minütiger (■) und 1stündiger (□) Inkubation. Die Membranen wurden mit 1% SDS (Endkonzentration) lysiert und der lösliche Überstand auf Sephacryl S-1000 chromatographiert.

2. Einfluß der Wachstumsphase auf die Kettenlänge

Frühere Versuche zeigten, daß die Hyaluronatsyntheserate umgekehrt proportional zur Zelldichte ist. Sie ist bei Zellen in der exponentiellen Phase hoch, während sie in der stationären Phase rasch abnimmt (84). Daraus ergibt sich die Frage, ob die Hyaluronatsynthese dabei verändert wird und ob Plasmamembranen, aus der jeweiligen Phase unterschiedliche Kettenlängen synthetisieren.

Dazu wurde die Plasmamembran von 3T3-Zellen, die entweder aus der stationären oder der exponentiellen Wachstumsphase gewonnen wurde, 8 Stunden mit Substrat inkubiert und Überstände und Pellets jeweils einer Gelfiltration unterzogen.

Die Kettenlänge des Hyaluronats sowohl vom Überstand als

auch von der Plasmamembran war in beiden Wachstumsphasen identisch. Dadurch konnte gezeigt werden, daß sich zwar in der exponentiellen Phase die Syntheserate stark verändert, aber das Molekulargewicht und damit der Mechanismus der Abspaltung gleich bleibt.

3. Lokalisierung des Kettenabbruchs

Durch die in vivo Versuche konnte ausgeschlossen werden, daß die Kette unspezifisch durch Radikale degradiert wird. Der genaue Ort des Kettenabbruchs konnte dabei jedoch nicht bestimmt werden.

Dies sollte mit verschiedenen 'pulse-chase' markierten Hyaluronatketten möglich sein, wenn man deren Abspaltung aus der Plasmamembran unter gleichen Bedingungen über einen bestimmten Zeitraum verfolgt. Dazu wurden B6-Membranen nacheinander mit markiertem und unmarkiertem Substrat inkubiert, so daß die in Abb. 8 gezeigten, an der Plasmamembran verankerten Ketten entstanden:

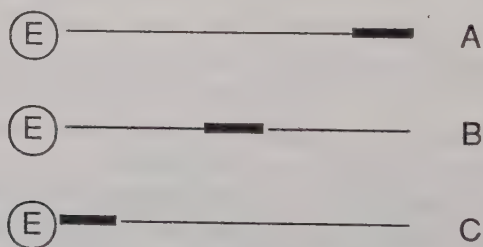


Abb. 8: An B6-Membranen (E) verankertes 'pulse-chase' markiertes Hyaluronat.

Inkubationsbedingungen:

A) 30 Minuten mit UDP- ^{14}C -GlcA markiertem und 3 Stunden mit unmarkiertem Substrat,

B) 1.5 Stunden mit unmarkiertem, 30 Minuten mit markiertem und 1.5 Stunden mit unmarkiertem Substrat,

C) 3 Stunden mit unmarkiertem und 30 Minuten mit markiertem Substrat.

(■) ^{14}C -GlcA markiertes Hyaluronat,

(—) unmarkiertes Hyaluronat.

Nach der Inkubation wurden diese Plasmamembranen abzentrifugiert, mehrmals gewaschen und die zeitliche Abspaltung der Kette in Natriumphosphatpuffer ohne Synthese verfolgt, wobei die Bedingungen so gewählt wurden, daß keine Neusynthese stattfinden konnte. Aus der Übereinstimmung der Summen des ^{14}C -GlcA-Einbaus aus Plasmamembran und Überstand ist zu ersehen, daß dies auch gewährleistet war (Tab. 6).

Einbau von ^{14}C -GlcA			
Std.	A	B	C
0	35	732	726
1	40	731	702
2	42	731	746
3	30	727	767
4	112	706	802
6	39	702	842

Tab. 6: Summe des ^{14}C -GlcA-Einbaus in Hyaluronat aus Plasmamembran und Überstand während einer Abspaltungskinetik von 'pulse-chase' markierten Hyaluronatketten in Phosphatpuffer ohne Synthese. (Bezeichnung s. Abb. 8).

Bei einer Abspaltung direkt an der Plasmamembran sollte bei A, B und C (Abb. 8) während der Zeitkinetik ein gleiches Abspaltungsprofil der abgegebenen Radioaktivität erhalten werden. Im Gegensatz dazu müßte bei einer der Plasmamembran weiter entfernt gelegenen Degradationsstelle bei A und B mehr markiertes Hyaluronat im Überstand zu finden sein.

Die im Überstand gemessenen Radioaktivitäten ergaben keinen Unterschied zwischen der Markierung der Kette direkt an der Membran (C) und der Markierung innerhalb der Kette (B). Im Gegensatz dazu konnte bei den endmarkierten Ketten (A) keine Radioaktivität im Überstand gemessen werden (Abb. 9). Dies kann dadurch bewirkt worden sein, daß die mar-

kierten Ketten lang genug waren, um bei der nachfolgenden Inkubation mit unmarkiertem Substrat abgespalten zu werden. Aus diesem Ergebnis läßt sich ableiten, daß die Hyaluronatkette direkt an der Membran abgespalten wird.

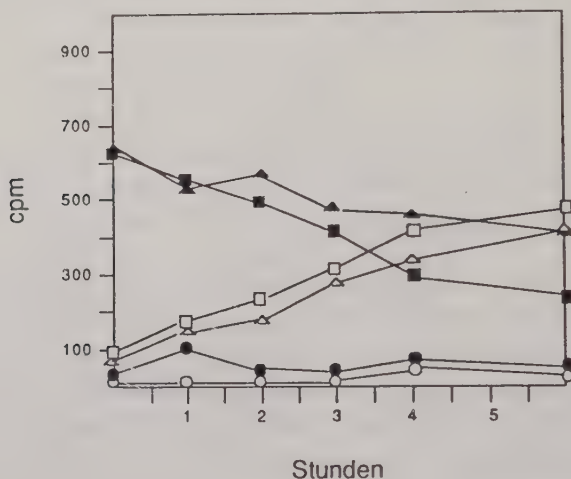


Abb. 9: Abspaltungskinetik der entsprechend Abb. 8 mit ^{14}C -GlcA 'pulse-chase' markierten Hyaluronatketten in Phosphatpuffer.

(●) Plasmamembran A,	(○) Überstand A;
(▲) Plasmamembran B,	(△) Überstand B;
(■) Plasmamembran C,	(□) Überstand C.

Zum gleichen Resultat führte obiger Versuch, wenn anstelle der B6-Membranen Protoblastenmembranen von Streptokokken eingesetzt wurden. Dieser Befund deutet auf einen ähnlichen Abspaltungsmechanismus bei Prokaryonten und Eukaryonten hin.

4. Kettenlänge in Abhängigkeit der Substratkonzentration

Wird die Hyaluronatkette nach bestimmten, gleichbleibenden Zeitspannen von der Membran abgespalten, dann sollte eine langsamere Syntheserate zu einem niedrigeren Molekulargewicht führen. Eine Möglichkeit, die Umsetzung der Vorläufermoleküle zu verlangsamen, besteht darin, die Substratkonzentration zu variieren. Deshalb wurden B6-Membranen mit 100%, 50% und 25% der Substratlösung versetzt und inkubiert. Die Überstände wurden durch Zentrifugation vom Pellet abgetrennt. Mit jeweils einem Aliquot der Pellets wurde die eingebaute Radioaktivität über absteigende Papierchromatographie bestimmt. Die Hyaluronatsyntheserate zeigte in diesem Bereich eine lineare Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Abb. 10).

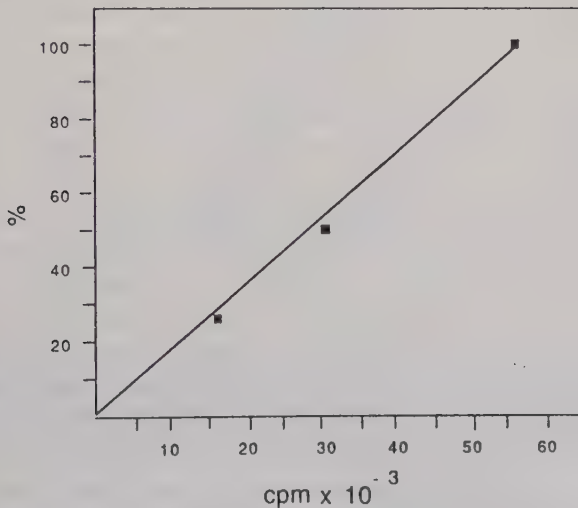


Abb. 10: Abhängigkeit der Hyaluronatsyntheserate von der Substratkonzentration.

Die Bestimmung der Kettenlänge aus den einzelnen Fraktionen ergab, daß im Überstand nur eine definierte Kettenlänge gemessen werden konnte, die der nach einer Stunde

Inkubation erreichten maximalen Größe entsprach (Abb. 7). Im Gegensatz dazu nahm die Kettenlänge an den Membranen mit zunehmender Verdünnung des Substrats ab (Abb. 11). Wurden die Membranen mit verdünnter Substratlösung so lange inkubiert, bis eine vergleichbare Einbaurrate zu der 100% Substratlösung erreicht wurde, dann konnte auch an der Membran nur mehr die maximal synthetisierte Molekulargewichtsgröße nachgewiesen werden.

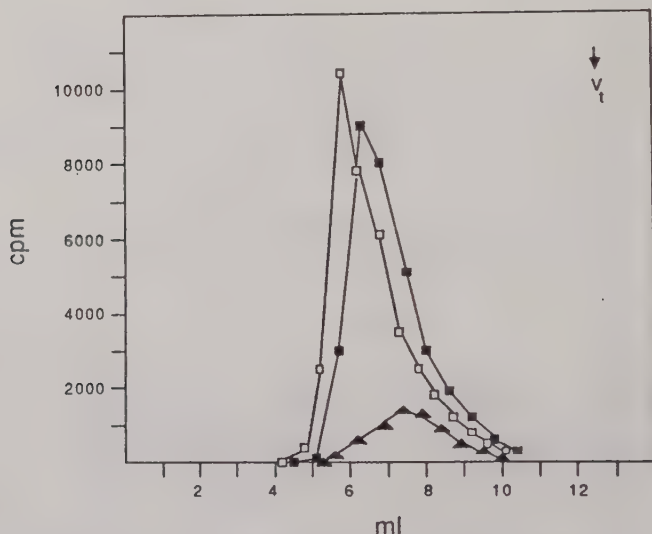


Abb. 11: Größenverteilung des membrangebundenen Hyaluronats aus B6-Membranen in Abhängigkeit der Substratkonzentration. Die Membranen wurden mit SDS solubilisiert und auf Sephacryl S-1000 chromatographiert.

□ 100% Substrat,

■ 50% Substrat,

▲ 25% Substrat.

V_t = Ausschlußvolumen

Aufgrund dieses Ergebnisses konnte gezeigt werden, daß nur definierte Ketten mit hohem Molekulargewicht abgespalten werden, unabhängig von der zeitlichen Syntheseleistung. Dagegen sind bei langsamerer Umsetzung des Substrats mehr

kurze als lange Hyaluronatmoleküle an der Membran vorhanden, weshalb überwiegend diese bei der nachfolgenden Chromatographie gefunden werden.

5. Kettenlänge in Abhängigkeit von Inhibitoren

Eine andere Möglichkeit die Synthese zu verlangsamen, kann durch den Einsatz kompetitiver Inhibitoren erreicht werden. Ein kompetitiver Hemmstoff ist UDP-GlcNAc, eines der beiden Substratmoleküle, wenn es im Überschuß zugegeben wird (120).

Das bis jetzt bestehende Enzymmodell geht davon aus, daß für die Bindung der beiden UDP-Zucker zwei spezifische Enzymtaschen vorhanden sind. Die inhibierende Wirkung von UDP-GlcNAc läßt sich damit erklären, daß dieses auch die Enzymtasche für UDP-GlcA besetzt, welches danach nur durch Konkurrenz des Inhibitors umgesetzt werden kann.

Die im Enzymassay verwendete Endkonzentration beträgt für UDP-GlcNAc 83 μ M. Wurde die Konzentration von UDP-GlcNAc auf 1 mM Endkonzentration erhöht, dann erniedrigte sich die Einbaurrate von 14 C-GlcA in einer Zeitkinetik während der ersten 60 Minuten um 50%. Die Reaktion kam mit normaler Substratkonzentration nach 90 Minuten zum Stillstand, während mit zusätzlichem UDP-GlcNAc der Endwert des radioaktiven Einbaus erst nach 4 Stunden erreicht wurde (Abb. 12). Der Verlauf der Kurve entspricht dem typischen Verhalten bei kompetitiver Inhibition, d.h., der Endwert der Reaktion wird zwar erreicht, jedoch wesentlich langsamer als ohne Zusatz des Inhibitors.

Vorstellbar wäre, daß ein Kettenabbruch durch aufeinander folgende Fehlübertragungen der Kette auf nur eines der Substrate erfolgen könnte und somit die Kette vom Enzym nicht mehr erkannt und verlängert werden kann. Sollte sich diese Hypothese als richtig erweisen, dann würde bei einem Überschuß eines der beiden Substratmoleküle die Wahrscheinlichkeit eines Kettenabbruches steigen und damit das Molekular-

gewicht des Hyaluronats kleiner werden.

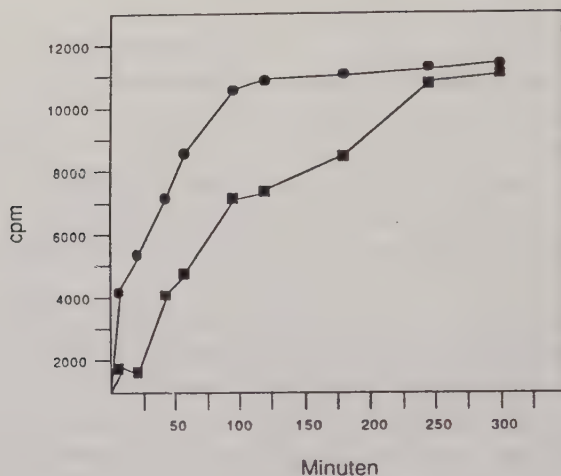


Abb. 12: Einbau von ^{14}C -GlcA in Hyaluronat bei B6-Membranen mit normaler Substratlösung ($83 \mu\text{M}$ UDP-GlcNAc) (●) und in Gegenwart von 1 mM UDP-GlcNAc (■).

Die Kettenlängen, die sich ergaben, wenn B6-Membranen mit 1 mM UDP-GlcNAc inkubiert wurden, zeigten keinen wesentlichen Unterschied zu den ohne Inhibitor nach 1 Stunde erhaltenen Größen. Das Molekulargewicht des Überstandes änderte sich nicht im Vergleich zum Kontrollwert, während an der Plasmamembran kürzere Ketten zu finden waren. Die Änderung des Molekulargewichts an der Plasmamembran ist möglicherweise wiederum auf die langsamere Umsetzung der Substratlösung zurückzuführen, wie es auch schon mit den niedrigen Substratkonzentrationen zu beobachten war (s.C.II.4.). Jedoch wird die Abspaltung des Hyaluronats nicht durch kompetitive Inhibition verändert.

6. Kettenlängen und Aktivitäten in Gegenwart von Adenosinnukleotiden

Appel et al. (47) haben beschrieben, daß keine zellfreie Synthese des Hyaluronats ohne Zusatz von ATP bei normalen Hautfibroblasten und bei Fibroblasten von Patienten mit Marfansyndrom stattfindet. Bei anderen Zelllinien werden durch ATP jedoch unterschiedliche Wirkungen festgestellt. Bei einigen Zelllinien wird die Synthese durch ATP gehemmt, während sie im Falle der HT 1080-Zellen durch 5 mM ATP maximal aktiviert wird (120,121).

Um zu untersuchen, ob der unterschiedliche Einfluß von ATP auch eine unterschiedliche Auswirkung auf die Kettenlänge des Hyaluronats ausübt, wurden die Membranen von B6- und HT 1080-Zellen für die weiteren Experimente herangezogen, da ATP in einem System hemmend, im andern aktivierend wirkt.

Die inhibierende Wirkung von ATP bei B6-Membranen kann auf folgenden Gründen beruhen:

- a) ATP komplexiert die Mg^{2+} -Ionen und inaktiviert somit das Enzym.
- b) ATP kann aufgrund seiner negativen Ladung, die ähnlich zu den Substratmolekülen ist, beide Enzymtaschen besetzen.

Durch Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration bei Inkubationen mit ATP von 10 mM auf 30 mM wurde ausgeschlossen, daß die Hemmung der Hyaluronatsynthese auf der Komplexbildung der Mg^{2+} -Ionen beruht.

Ist die Blockierung der Enzymtaschen für die inhibierende Wirkung maßgebend, dann besteht die Möglichkeit, daß ATP die Hyaluronatkette aus der Tasche verdrängt und den Kettenabbruch herbeiführt. Das Molekulargewicht des abgespaltenen Hyaluronats sollte dann in Gegenwart von ATP kleiner sein als in den Kontrollversuchen.

Um die inhibierende Wirkung zu verstärken, wurde die

ATP-Konzentration auf 10 mM erhöht. Die Membranen wurden abzentrifugiert und aus dem Überstand das Molekulargewicht bestimmt. Jedoch konnte keine Veränderung der Kettenlänge gegenüber den Kontrollwerten, die ohne ATP durchgeführt worden waren, festgestellt werden.

Im Gegensatz zu den B6-Membranen wird bei HT 1080-Plasmamembranen eine maximale Stimulierung der Hyaluronatsynthese bei 2,5 - 5 mM ATP erreicht (Abb. 13). Dies gibt aber keinen Aufschluß über das Aktivitätsprofil, das in einer Zeitkinetik in Gegenwart von ATP gegenüber dem Kontrollwert erhalten wird.

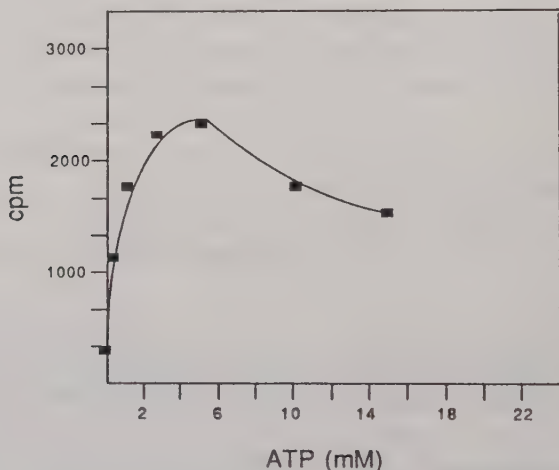


Abb. 13: Abhängigkeit der Hyaluronatsynthese aus HT 1080-Zellen von der zugesetzten ATP-Konzentration nach 3stündiger Inkubation mit UDP- ^{14}C -GlcA markiertem Substrat.

Deshalb wurden die Plasmamembranen mit verschiedenen ATP-Konzentrationen (0 - 20 mM) über 30 Stunden mit Substrat inkubiert. Nach bestimmten Zeiten wurden Aliquots entnommen und ihr ^{14}C -GlcA-Gehalt bestimmt. Das Ergebnis (Abb. 14) stimmt mit Abb. 13 gut überein. Mit 2 mM ATP wird maximale

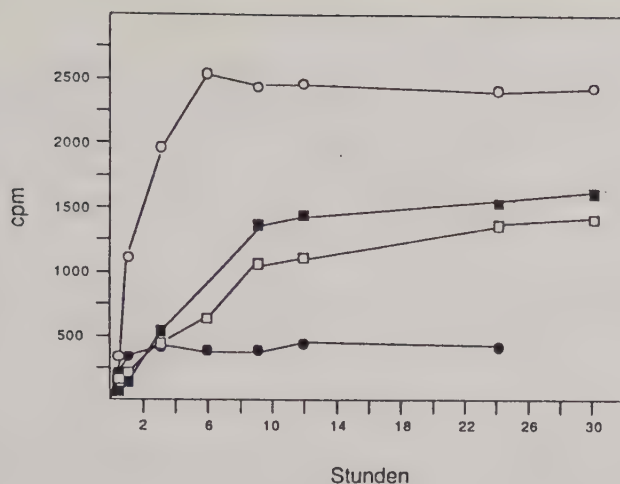


Abb. 14: Kinetik der Hyaluronatsynthese von HT 1080-Plasma-membranen in Gegenwart von
 2 mM ATP (○), 10 mM ATP (■),
 20 mM ATP (□), ohne ATP (●).

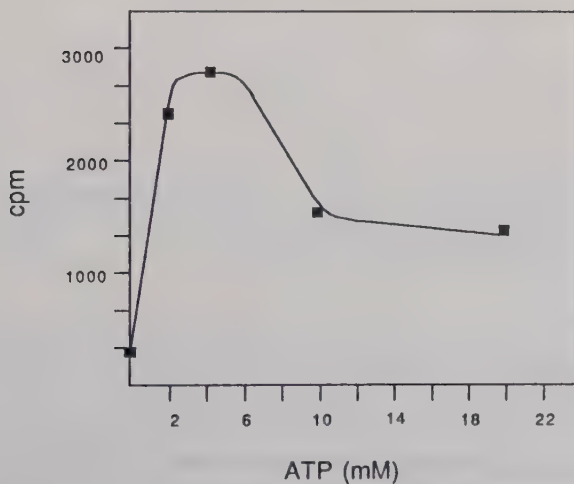


Abb. 15: V_{max} von HT 1080-Plasmamembranen in Abhängigkeit von der zugesetzten ATP-Konzentration.

Stimulierung und ein ca. 8fach höheres Plateau als bei dem Kontrollwert erreicht (Abb. 15).

Gleichzeitig erhöhte sich mit steigender ATP-Konzentration die Zeit, die das Enzym aktiv synthetisierte (Abb. 16). Bei ca. 16 mM ATP wurde ein Plateau mit 11 - 12 Stunden aktiver Syntheseleistung erreicht. Entsprechende Beobachtungen waren schon bei Teratocarcinoma-Zellen beschrieben worden (76).

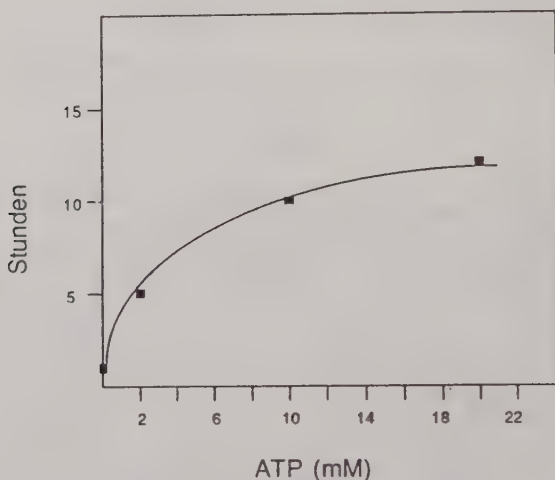


Abb. 16: Synthesedauer der Hyaluronatsynthase in HT 1080-Plasmamembranen in Abhängigkeit von der zugesetzten ATP-Konzentration.

Zur Erklärung lassen sich verschiedene Hypothesen aufstellen:

- a) Die Enzymaktivität wird wie bei der Kaskade des Glykogenabbaus durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung der beteiligten Enzyme reguliert (Abb. 17) (122).

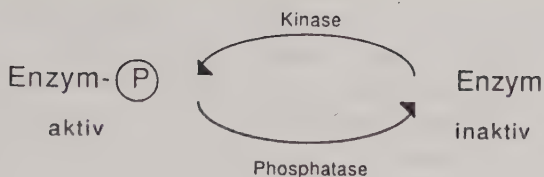


Abb. 17: Hypothetisches Modell zur Regulation der Enzymaktivität durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung des Enzyms.

- b) ATP aktiviert spezifisch, indem es an das Enzym bindet, welches daraufhin in eine aktivere Konfiguration umgewandelt wird.
- c) ATP hemmt kompetitiv Phosphatasen, die das Enzym inaktivieren könnten (Abb. 17) und schützt gleichzeitig die Substrate vor einer Degradierung.

Würde das Enzym tatsächlich durch Phosphorylierung aktiviert, dann könnte die erhöhte Syntheserate in Gegenwart von ATP durch eine Aktivierung membranständiger Kinasen erklärt werden, die das Protein in seine aktive Form umwandeln. Eine zu hohe ATP-Konzentration könnte dann jedoch wieder die Umsetzung der Substratmoleküle vermindern, indem diese durch die Abstoßung der Ladungen vom Aktivitätszentrum entfernt werden.

Ob bei einer Reaktion Phosphat übertragen wird, läßt sich durch das ATP-Analogon Adenylyl-(β - γ -methylen)-diphosphonat (AMP-PCP) nachweisen (Abb. 18). In AMP-PCP ersetzt eine Methylenbrücke den Sauerstoff zwischen den β - und γ -Phosphoratomen. Daher können enzymatische Reaktionen, die eine Spaltung zwischen dem β - und γ -Phosphoratomen bewirken, nicht ablaufen. Die Methylenbrücke verändert die Konfiguration nicht wesentlich (123), so daß in allen anderen Reak-

tionen bei denen ATP benötigt wird, dieses durch AMP-PCP ersetzt werden kann. Daß das PCP-Analogon das natürliche Nukleotid ersetzen kann, wurde schon von Rodbell et al. beschrieben (124). Er zeigte, daß GMP-PCP, wie GTP, an Glukagon bindet und damit die Aktivität der Adenylatcyclase gesteigert werden kann.

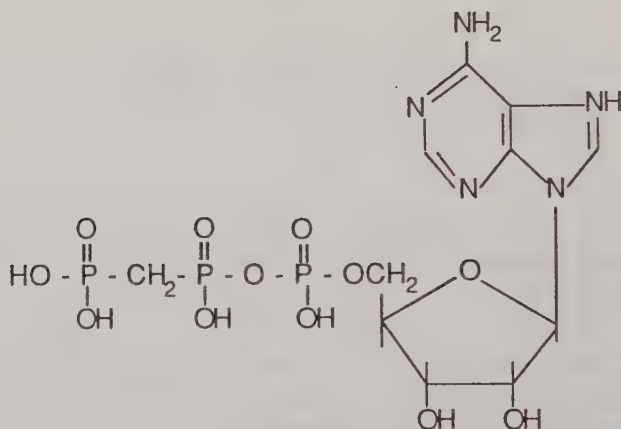


Abb. 18: Struktur von AMP-PCP

Da das Enzym in Gegenwart von AMP-PCP nicht durch Phosphorylierung aktiviert werden kann, müßte die ^{14}C -GlcA-Einbaurate dem Kontrollwert ohne ATP entsprechen.

Um ATP und sein Analogon zu vergleichen, wurden HT 1080-Plasmamembranen unter Zusatz von 10 mM ATP, 10 mM AMP-PCP und ohne ATP über 30 Stunden mit markierten Substrat inkubiert. Nach unterschiedlichen Zeiten wurden jeweils Aliquots entnommen und deren Hyaluronatgehalt bestimmt. Abb. 19 zeigt, daß auch AMP-PCP aktiviert. Damit konnte ausgeschlossen werden, daß die Aktivitätssteigerung auf eine Phosphorylierung der Hyaluronatsynthase zurückzuführen ist. AMP-PCP stimuliert bei gleicher Konzentration noch stärker als ATP. Es wird nicht nur die Gesamteinbaurate von ^{14}C -GlcA erhöht, sondern das Enzym ist unter diesen Bedingungen über

einen noch längeren Zeitraum aktiv.

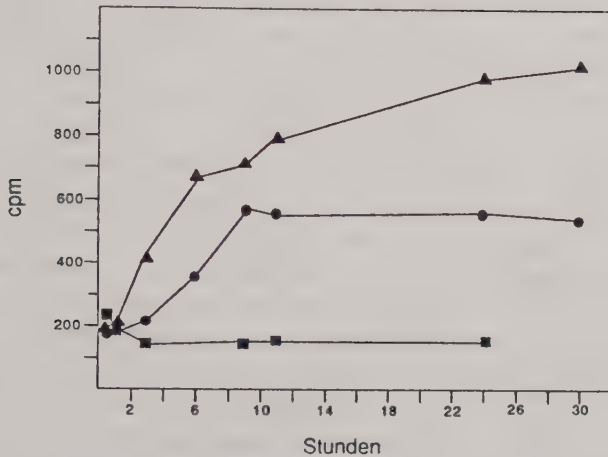


Abb. 19: Zeitkinetik der Hyaluronatsynthese aus HT 1080-Plasmamembranen, die mit UDP- ^{14}C -GlcA markiertem Substrat inkubiert wurden, in Gegenwart von 10 mM AMP-PCP (▲), 10 mM ATP (●), ohne Zusatz (■).

Dieses Ergebnis deutete darauf hin, daß die Aktivitätssteigerung durch ATP aufgrund einer spezifischen Bindung des Moleküls an das Enzym erreicht wird und durch AMP-PCP, das sich strukturell nur unwesentlich von ATP unterscheidet, ersetzt werden kann.

Ob die Aktivitätssteigerung durch ATP spezifisch ist, sollte im nachfolgenden überprüft werden, indem ATP durch AMP und ADP ersetzt wurde. Dazu wurden HT 1080-Plasmamembranen mit 10 mM AMP, ADP und ATP versetzt und mit radioaktiv markiertem Substrat ebenfalls über eine Zeitdauer von 30 Stunden inkubiert. Die Auftragung der gemessenen Radioaktivitäten der einzelnen Zeitwerte ergab, daß kein Unterschied zwischen den AMP, ADP und ATP besteht (Abb. 20). Das Enzym wird im Vergleich zu den Kontrollwerten jeweils gleich stark aktiviert.

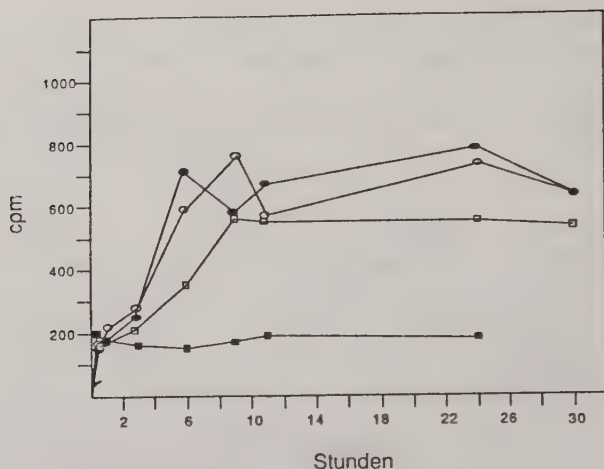


Abb. 20: Zeitkinetik der Hyaluronatsynthese aus UDP- ^{14}C -GlcA markierten HT 1080-Plasmamembranen in Gegenwart von 10 mM AMP (○), 10 mM ADP (●), 10 mM ATP (□), ohne Zusatz (■).

Damit konnte eine spezifische Aktivitätssteigerung durch ATP ausgeschlossen werden. Dies bedeutet jedoch nicht, daß die Nukleotide nicht an das Enzym binden können. Bei der Adenylatcyclase, die durch eine Bindung von GTP an Glukagon stimuliert wird, konnte ebenfalls gezeigt werden, daß diese Stimulation nicht nur für ein Nukleotid spezifisch ist (124). Es konnte auch bei Rattenfibroblasten (SEN-Zellen) (89) und bei differenzierten Teratocarcinoma-Zellen (76) nachgewiesen werden, daß die Hyaluronatsynthaseaktivität durch verschiedene Nukleotide, die unterschiedlich phosphoryliert sind, gesteigert werden kann.

Eine einfache Erklärungsmöglichkeit für die Stimulierung der Synthese durch Nukleotide beschrieben Appel et al. (47). Sie führten die Steigerung der Syntheserate in Gegenwart von ATP auf eine kompetitive Inhibition der Hydrolyse von UDP-GlcNAC durch Phosphatasen zurück.

Diese Interpretation erklärt aber nicht, warum AMP-PCP

die Syntheseleistung des Enzyms höher und andauernder als andere Nukleotide stimuliert. Da AMP-PCP im neutralen Bereich zu Mg^{2+} -Ionen eine 3fach höhere Affinität als ATP aufweist (125), wäre es vorstellbar, daß das Analogon dem Enzym das für seine Aktivität nötige divalente Kation in höherem Ausmaß zur Verfügung stellt, als das natürliche Nukleotid.

Da durch inhibierende Faktoren keine Veränderung der Kettenlänge bewirkt worden war, sollte die Frage untersucht werden, ob im Gegensatz zu B6-Membranen bei HT 1080-Plasmamembranen eine Abhängigkeit der Kettenlänge des Hyaluronats von der zugesetzten ATP-Konzentration besteht.

Dazu wurden die Plasmamembranen mit Substrat und den jeweiligen ATP-Konzentrationen 24 Stunden inkubiert. Diese lange Inkubationszeit ergab sich zum einen aus den Syntheseleistungen der einzelnen Zelllinien *in vitro* (s.C.I.1.2), wobei die Hyaluronatsynthase bei HT 1080-Zellen die geringste Aktivität aufwies. Zum andern synthetisieren Plasmamembranen in Gegenwart von ATP Hyaluronat über diesen Zeitraum.

Nach der Inkubation wurden die Membranen vom Überstand abzentrifugiert. Aus den Überständen wurde die Größe des abgespaltenen Hyaluronats bestimmt. Das Molekulargewicht des Hyaluronats der Proben mit 2, 10 und 20 mM ATP unterschied sich jedoch nicht vom Kontrollwert ohne Zusatz von ATP.

Damit konnte gezeigt werden, daß mit Hilfe von ATP zwar die Syntheserate und die Synthesedauer des Enzyms, nicht aber die Kettenlänge des sezernierten Hyaluronats variiert werden kann.

7. Versuch der Isolierung der reinen, aktiven Hyaluronatsynthase

Da externe Faktoren und verschiedene Kulturbedingungen keinen Einfluß auf den Kettenabbruch zeigten, sollte untersucht werden, ob zur Abspaltung der Hyaluronatkette ein zweites, von der Hyaluronatsynthase unabhängiges Protein nötig ist. Dazu mußte das Enzym aktiv isoliert werden. Bisher war nur die Isolierung des denaturierten Enzyms aus Streptokokken beschrieben worden (81), das nicht mehr renaturiert werden konnte.

Eine denkbar schonende Möglichkeit das Enzym in seiner aktiven Form zu isolieren bestand darin, das Protein über eine Affinitätssäule mit spezifischen Antikörpern aufzureinigen.

Zur Herstellung des Antigens wurde das 52 kd Protein aus den Überständen der Membranisolierung aus Streptokokken angereichert, da sie, wie schon beschrieben, etwa die gleiche Enzymmenge wie die Membranfraktion besitzen.

Die Anreicherung des Enzyms erfolgte analog der Isolierung von Hyaluronat, unter der Annahme, daß die naszierenden Hyaluronatketten noch mit dem Enzym assoziiert sind. Daher wurden die Proteine des Überstandes in Cardiolipinvesikel eingebaut, welche anschließend mit unmarkiertem Substrat inkubiert wurden. Die darauffolgende Ionenaustauscherchromatographie auf DEAE-Sephacel erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie für Hyaluronat. Eluiert wurde mit einem Gradienten zwischen 0 - 0.6 M NaCl bei pH 8.4. Da Hyaluronat bei etwa 0.3 M NaCl eluiert, wurden die Fraktionen zwischen 0.25 und 0.35 M NaCl gesammelt und durch eine SDS-PAGE-Elektrophorese auf ihr Proteinemuster untersucht (Abb. 21). Dabei wurde die 52 kd große Hyaluronatsynthase angereichert und anschließend aus einem präparativen Gel ausgeschnitten und mit komplettem Freund'schen Adjuvans subcutan einem Kaninchen injiziert. Aus dem erhaltenen Serum wurden die Immunglobuline mit 50% Ammoniumsulfat gefällt, anschließend gewaschen und in Wasser suspendiert. Über-

schüssiges Ammoniumsulfat wurde durch Dialysieren gegen Wasser entfernt. Die Lösung wurde lyophilisiert und der Antikörper als Trockenpulver bei -20°C aufbewahrt.

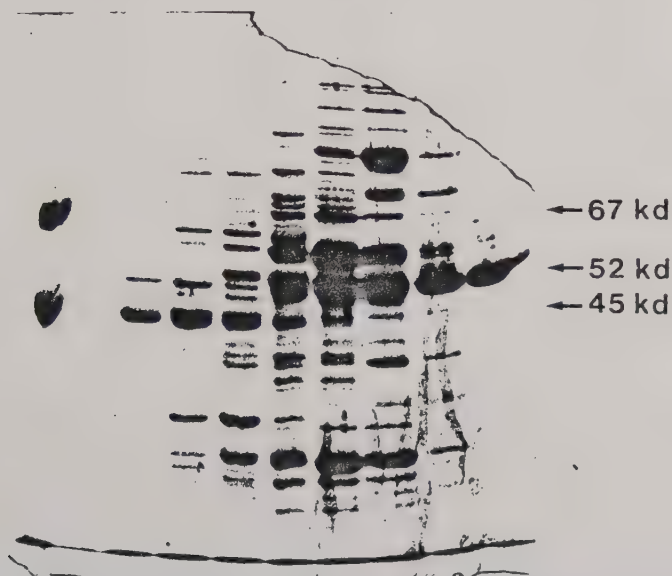


Abb. 21: SDS-PAGE-Elektrophorese von Streptokokkenüberständen nach einer Ionenaustauscherchromatographie. Aufgetragen wurden die Fraktionen, die zwischen 0.25 und 0.35 M NaCl eluierten, wobei die 52 kd große Hyaluronatsynthase angereichert wurde.

Die Spezifität des Antikörpers ließ sich im Immunoblot nachweisen. Bis zu einer Verdünnung von 1:1000 war nur eine Bande sichtbar, während das Präimmunserum keine Reaktion zeigte (Abb. 22).

Diese Antikörper wurden anschließend an Affi-Gel-10, ein N-Hydroxysuccinimidester, der an eine Agarosematrix gebunden ist, gekoppelt und überschüssige Bindungsstellen der Gelmatrix wurden mit Ethanolamin abgesättigt. Anschließend wurde der Streptokokkenüberstand aufgetragen. Unter der Annahme, daß das Protein zum Teil löslich in ihm enthalten

ist, konnte so auf die Zugabe von Detergenz verzichtet werden.

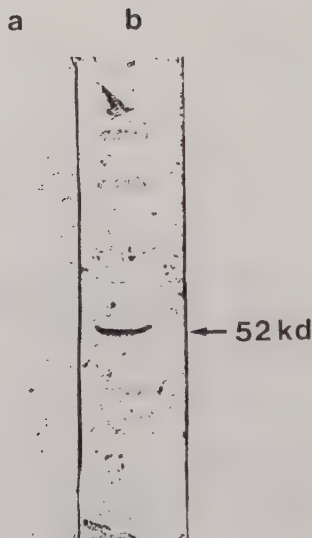


Abb. 22: Immunoblot von Streptokokkenmembranen mit Antikörpern gegen das 52 kd Protein. Die spezifisch gebundenen Antikörper wurden mit Hilfe von Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) in einer enzymatischen Reaktion nachgewiesen.

a.: Präimmunserum

b.: Immunserum

Wurde mit Glycin/HCl pH 2.5 eluiert, so konnte im Eluat mit Hilfe der Silberfärbung eine einzige Bande mit 52 kd angefärbt, jedoch keine Aktivität mehr erhalten werden. Daher wurden verschiedene Elutionsmittel zuvor an den Protoblastenmembranen getestet. Aus Tabelle 7 ist zu entnehmen, daß die herkömmlich beschriebenen Elutionsmittel (126,127) die Aktivität des Enzyms entweder völlig zerstörten oder stark erniedrigten. Als aktivitätserhaltend stellte sich 100 mM Glycin/HCl pH 3.5 heraus, wenn anschließend sofort mit

0.3 M Tris neutralisiert wurde.

	cpm/30 Min.
Kontrolle	123369
100 mM Citrat / PO_4^{3-} / pH 3	57521
3 M KSCN / 50 mM Tris / pH 8	13657
3 M MgCl_2 / 50 mM Tris / pH 6.8	14587
100 mM Glycin / HCl / pH 2.5	5732
100 mM Glycin / HCl / pH 3.5	125132

Tab. 7: Einbau von ^{14}C -GlcA in Hyaluronat bei Streptokokkenmembranen in Abhängigkeit des zur Affinitätssäule verwendeten Elutionsmittels.

Bei den nachfolgenden Versuchen mit Glycin/HCl pH 3.5 als Elutionsmittel konnte wiederum eine 52 kd Bande nachgewiesen werden. Jedoch konnte auch in diesem Falle im Eluat keine Aktivität bestimmt werden.

Dies war der erste Hinweis, daß es sich bei dem bisher gereinigten Protein nicht um die gesuchte Hyaluronatsynthase handelt. Diese Vermutung bestätigte sich in weiteren Experimenten. Die Proteinsequenzen, die von diesem Protein erhalten wurden, ergaben, daß das Protein etwa 50% Homologie zu Enolase aus Hefe besitzt und daher die hergestellten Antikörper mit großer Wahrscheinlichkeit auch gegen Enolase gerichtet sind, weshalb obiger Versuch nicht zum gewünschten Erfolg führen konnten.

III. Hyaluronatsynthese während der Mitose bei HE-Zellen

In Abschnitt C.I.4. war untersucht worden, ob die Kettenlänge sich während des Zellzyklus verändert. Jedoch konnten in den verschiedenen untersuchten Stadien keine Unterschiede festgestellt werden.

Als bemerkenswertes Ergebnis ergab sich dabei, daß die Hyaluronatsynthaseaktivität sich während der kurzen Zeitspanne der Mitose, zwischen der Metaphase und der Cytokinese, dramatisch änderte.

Im folgenden sollte diese Aktivitätsänderung genauer untersucht werden. Daher wurde die Kinetik der Hyaluronatsynthese bei unbehandelten Zellen und bei synchronisierten Zellen bestimmt.

1. Syntheserate von unbehandelten Zellen

HE-Zellen wurden unter Zusatz von 8 μCi $^3\text{H}\text{-GlcN/ml}$ 40 Stunden kultiviert. Die Menge an synthetisiertem Hyaluronat wurde zu verschiedenen Zeiten sowohl im Kulturmedium als auch an den Zellen über Ionenaustauscherchromatographie bestimmt. Die Isolierung des Hyaluronats erfolgte wie unter C.I.1.2 beschrieben.

Die unbehandelten Zellen zeigten ihre normale spindelförmige Morphologie (Abb. 23a).

Abbildung 23 zeigt, daß die synthetisierte Menge an Hyaluronat über den Zeitraum von 40 Stunden sowohl an der Zelle selbst, als auch im Kulturmedium leicht ansteigt.

Nach 40 Stunden wurde das Medium gewechselt und nach 4 Stunden die Verteilung des an der Zellmembran anhaftenden, radioaktiv markierten Hyaluronats gemessen.

Während sich im Medium die Radioaktivität verringerte, blieb sie an der Zellmembran konstant, was auf noch radioaktiv markierte Vorläufermoleküle in der Zelle schließen läßt.

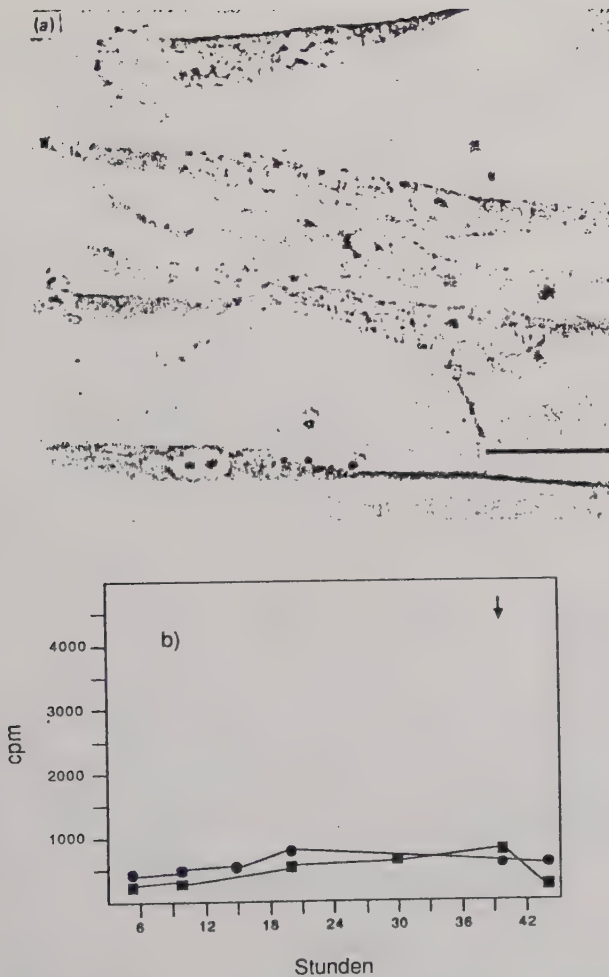


Abb. 23: Hyaluronatproduktion von unsynchronisierten HE-Zellen.

a) HE-Zellen in DMEM (der Balken stellt 50 μm dar).
 b) Einbau von ^3H -GlcN in das zellgebundene (●) und extrazelluläre (■) Hyaluronat pro 10^6 Zellen nach Ionenaustauscherchromatographie auf DEAE-Sephacel. Nach 40 Stunden (Pfeil) wurde das radioaktiv markierte Medium gegen normales Medium gewechselt.

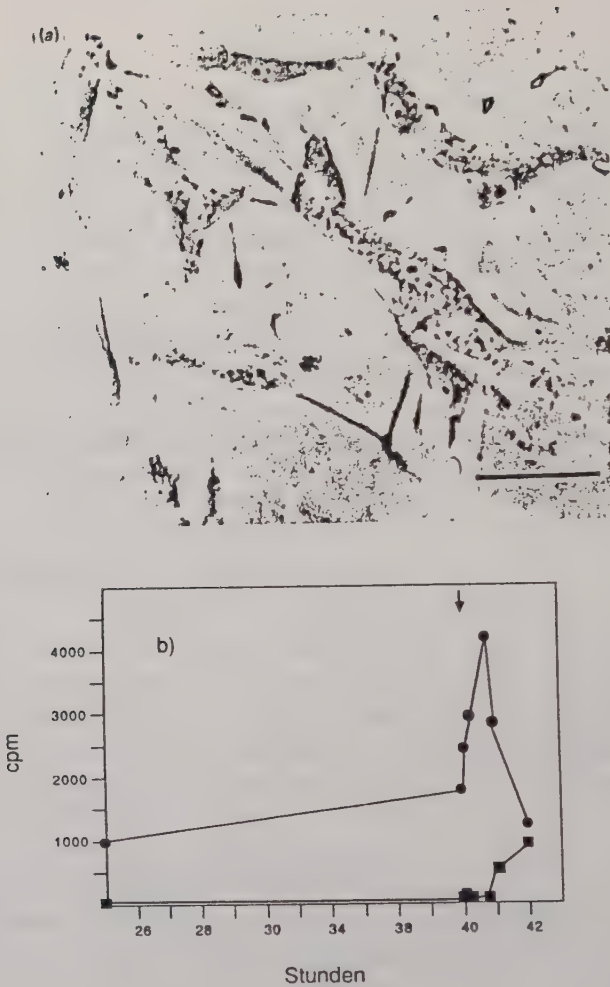


Abb. 24: Hyaluronatproduktion von HE-Zellen, die mit Colchicin synchronisiert sind.

a) HE-Zellen nach der Zugabe von $0.01 \mu\text{g/ml}$ Colchicin (der Balken stellt $50 \mu\text{m}$ dar).

b) Einbaurate von ^3H -GlcN in das celluläre (●) und extrazelluläre (■) Hyaluronat pro 10^6 Zellen nach DEAE-Ionenaustauscherchromatographie. Nach 40 Stunden (Pfeil) wurden die Zellen in DMEM ohne Colchicin überführt.

2. Syntheserate von HE-Zellen während des Colchicin Blocks

HE-Zellen wurden unter Zusatz von $^3\text{H-GlcN}$ kultiviert und 15 Stunden vorinkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurde den Zellen jeweils 0.01 $\mu\text{g/ml}$ Colchicin zugegeben, wodurch sie in der Metaphase während der Mitose arretiert werden. Die Zellen begannen nach ca. 4 Stunden ihre Morphologie zu verändern. Sie waren immer noch gut ausgebreitet, jedoch zeigten sie eine kürzere und breitere Struktur als die unbehandelten Zellen.

Nach 0, 15, 25, 30, 34, 37 und 40 Stunden wurden die einzelnen Schalen aufgearbeitet und die Menge radioaktiv markierten Hyaluronats gemessen. In parallel laufenden Versuchsansätzen wurde Colchicin nach 40 Stunden mit dem Medium ausgewaschen. Nach der Zugabe von normalem Medium wurde die Verteilung des Hyaluronats 10, 20, 30, 45, 60 und 120 Minuten nach dem Medienwechsel untersucht. Während dieser Zeitspanne nahmen die Zellen allmählich wieder ihre normale Morphologie an.

In Anwesenheit von Colchicin konnte im Medium nur wenig Hyaluronat nachgewiesen werden, während an der Zellmembran eine leichte Zunahme zu beobachten war. Wurde Colchicin herausgewaschen, so stieg unmittelbar danach die zellgebundene Hyaluronatmenge stark an. Etwas verzögert erhöhte sich anschließend die Radioaktivität im Medium, während die Werte für die Zellmembran auf die der Kontrolle abfielen (Abb. 24b).

3. Syntheserate von HE-Zellen während des Cytochalasin B Blocks

Versetzt man die Zellen mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B, so verharren sie in der Cytokinese. Sie runden sich dabei ab und haften nicht mehr fest an der Unterlage an (Abb. 25a). Verfolgt man wiederum die Hyaluronatproduktion über 40 Stunden in Gegenwart des Inhibitors, so ist zu erkennen, daß

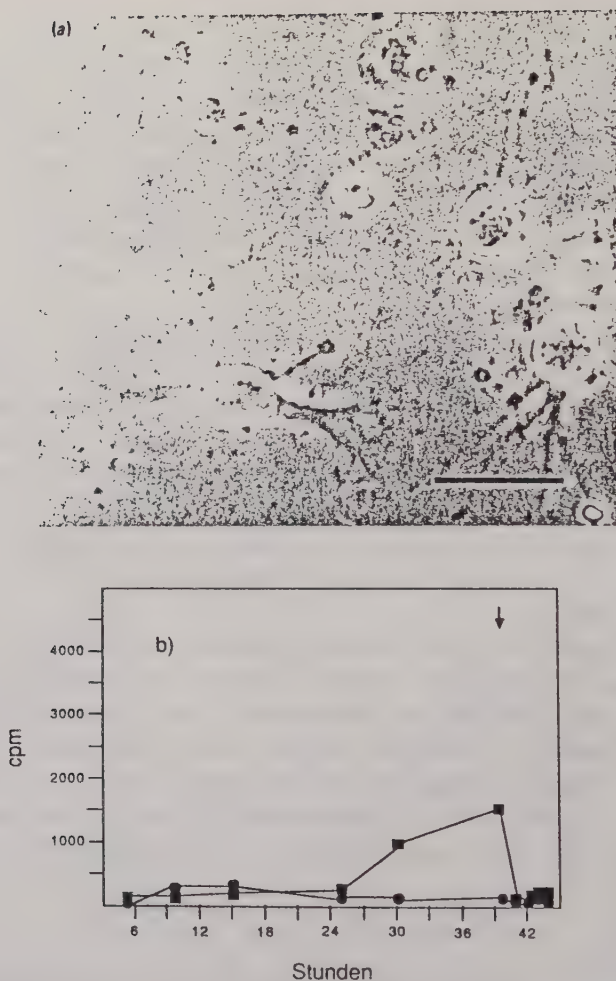


Abb. 25: Hyaluronatproduktion von HE-Zellen, die mit Cytochalasin B synchronisiert sind.

a) HE-Zellen nach der Zugabe von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Cytochalasin B (der Balken stellt 50 μm dar).

b) Einbaurate von ^3H -GlcN in das zelluläre (●) und extrazelluläre (■) Hyaluronat pro 10^6 Zellen nach DEAE-Ionenaustauscherchromatographie. Nach 40 Stunden (Pfeil) wurden die Zellen in DMEM ohne Cytochalasin überführt.

nach 25 Stunden die Hyaluronatmenge im Medium extrem ansteigt (Abb. 25b). Dies bedeutet, daß erst nach diesem Zeitraum alle Zellen die Mitose erreicht haben, und daß das Abrunden der Zellen gleichzeitig mit einer starken Zunahme der Hyaluronatsynthese verbunden ist. Das an der Zellmembran gebundene Hyaluronat dagegen bleibt während dieses Zeitraumes gering. Die nach dem Herauswaschen des Inhibitors nach 40 Stunden erhaltenen Werte fielen wieder auf die Anfangswerte ab.

Um zu kontrollieren, daß die Zellen durch Zugabe des Inhibitors zum einen synchron waren und zum andern wieder normal den nächsten Zyklus durchlaufen, wurde die Einbaurrate von ^3H -Thymidin in die DNA während der S-Phase bestimmt (128).

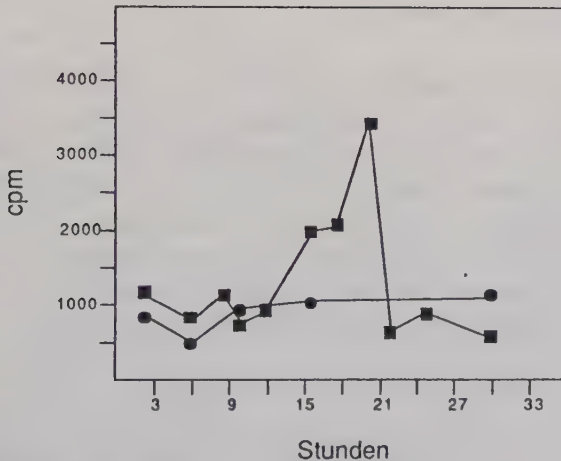


Abb. 26: Bestimmung der Synchronität von HE-Zellen durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA pro 10^6 Zellen. Die Zellen wurden 40 Stunden mit Cytochalasin B behandelt und zur Zeit 0 in normales Medium überführt. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen 30 Minuten mit ^3H -Thymidin inkubiert.
 (■) mit Cytochalasin B behandelte Zellen.
 (●) unbehandelte Zellen als Kontrolle.

Dazu wurden die Zellen 40 Stunden mit Cytochalasin B behandelt und anschließend in normalem Medium weiterkultiviert. 30 Minuten bevor die Zellen geerntet wurden, wurden sie zu den aus Abbildung 26 ersichtlichen Zeitpunkten mit $0.5 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin versetzt. Anschließend wurden die Zellen durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Die dadurch freigesetzte DNA wurde mit 30% Trichloressigsäure gefällt, das Pellet in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und der Einbau an Radioaktivität bestimmt. Der 5fach höhere Einbau an Radioaktivität nach 15 - 20 Stunden zeigt, daß die mit Cytochalasin B behandelten Zellen die S-Phase synchron erreichen (Abb. 26). Im Gegensatz dazu zeigen die unsynchronisierten Zellen kein Maximum an ^3H -Thymidin Einbau.

4. Bestimmung von Chondroitinsulfat und Heparansulfat in Gegenwart der Inhibitoren

Der Einfluß der erhöhten Hyaluronatsynthaseaktivität auf die Zellen kann nur dann zweifelsfrei auf diese zurückgeführt werden, wenn sich die Syntheserate der sulfatierten Glukosaminoglykane Heparansulfat und Chondroitinsulfat während der Mitose nicht wesentlich verändert. Daher wurde die Menge an ^3H -GlcN bestimmt, die nach Zugabe von Cytochalasin B und Colchicin nach 40 Stunden in diese Glukosaminoglykane gegenüber den unbehandelten Zellen eingebaut wird.

HE-Zellen wurden wiederum 15 Stunden mit ^3H -GlcN vorinkubiert und anschließend die Inhibitoren in den entsprechenden Konzentrationen zugegeben. Die eingebaute Radioaktivität wurde über Ionenaustauscherchromatographie ermittelt. Hyaluronat eluierte bei 0.35 M NaCl, während Heparansulfat und Chondroitinsulfat bei 0.435 M bzw. 0.52 M NaCl eluierten (129).

Neben einem leicht inhibierenden Effekt von Cytochalasin B auf die Synthese von Heparansulfat, änderte sich die Einbaurrate von ^3H -GlcN nicht gegenüber der Kontrolle (Tab. 8).

Weder Heparansulfat noch Chondroitinsulfat konnten jeweils im Medium nachgewiesen werden.

Einbau an ^3H -Glukosamin cpm/ 10^6 Zellen						

	Hyaluronat		Heparan- sulfat		Chondroitin- sulfat	
	Zelle	Medium	Zelle	Medium	Zelle	Medium

DMEM	1740	4765	2168	n.n.	3071	n.n.

DMEM + Cyto- chalasin	1112	41900	364	n.n.	2096	n.n.

DMEM + Colchicin	1714	1416	1046	n.n.	3334	n.n.

Tab. 8: Syntheserate der Glukosaminoglykane bei HE-Zellen während des Cytochalsin B bzw. Colchicin Blocks. Die Zellen wurden jeweils 40 Stunden mit den Inhibitoren inkubiert, anschließend lysiert und mit Protease behandelt. Der Einbau von ^3H -GlcN wurde über DEAE-Ionenaustauscherchromatographie bestimmt.

5. Bestimmung der Hyaluronatsynthaseaktivität in vitro während des Cytochalsin B Blocks

Um auszuschließen, daß die gemessene Hyaluronatmenge auf Artefakte zurückzuführen ist, die während der Einwirkung von Cytochalsin B und Colchicin in vivo auf die Zellen entstehen könnten, wie z.B. Änderung der intrazellulären Konzentration der beiden Substratmoleküle UDP-GlcNAc und UDP-GlcA, wurde die Synthaseaktivität nicht von den intakten

Zellen, sondern nur nach deren Aufschluß bestimmt.

Die Zellen wurden wie vorhergehend beschrieben, mit Cytochalasin B behandelt. Zu unterschiedlichen Zeiten nach der Inhibitorzugabe wurden die Zellen von der Kulturschale abgeschabt, um zu verhindern, daß durch Trypsinbehandlung die extrazelluläre Matrix der Zellen zerstört und damit die Hyaluronatsyntheseaktivität beeinflußt wird (s.C.I.2.1).

Durch Einfrieren und Auftauen wurden die Zellen aufgebrochen und mit markierter Substratlösung inkubiert.

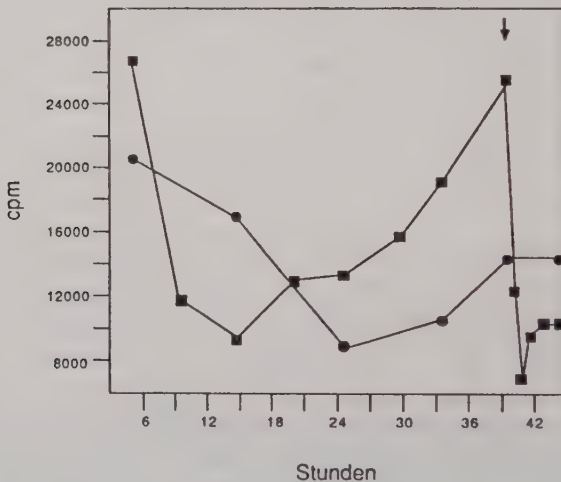


Abb. 27: Bestimmung der Hyaluronatsyntheseaktivität während des Cytochalasin B Blocks.

Die Zellen wurden mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B (■) und ohne Zusatz (●) kultiviert. Zu den angegebenen Zeiten wurden die Zellen abgeschabt, aufgebrochen und der Einbau an ^{14}C -GlcA pro 10^6 Zellen bestimmt. Nach 40 Stunden (Pfeil) wurden die Zellen in normales Medium überführt.

Entsprechend den Versuchen mit Zellkulturen stieg die Aktivität nach 25 Stunden stark an, während die unbehandelten Zellen keine bedeutenden Veränderungen zeigten (Abb. 27). Die nach dem Medienwechsel gefundene Aktivität fiel extrem ab und erreichte wieder die Kontrollwerte.

Die hohe Syntheserate in den ersten Stunden nach dem Medienwechsel bei den behandelten als auch bei den unbehandelten Zellen beruht auf einer Stimulierung durch fötales Kälberserum (FKS) (89).

Damit war ausgeschlossen, daß die in vivo gefundenen Ergebnisse auf Artefakte durch die Inhibitoren zurückzuführen waren. Gleichzeitig konnte bewiesen werden, daß sich die Hyaluronatsynthaseaktivität während der Mitose stark verändert.

6. Hemmung der Zellteilung durch perjodat-oxidierte Zucker

Die in den vorangegangenen Abschnitten besprochenen Daten gaben Anlaß, der Hyaluronatsynthese für die Mitose eine bedeutende Rolle zuzuschreiben. Um diese Frage genauer zu klären, sollte die Bedeutung der Hyaluronatsynthese während der Mitose mit spezifischen Inhibitoren genauer untersucht werden.

Die Verlängerung der Hyaluronatkette basiert auf der alternierenden Übertragung von UDP-Hyaluronat auf UDP-GlcNAc bzw. UDP-GlcA, wobei die Übertragung am reduzierenden Ende stattfindet (77). Aufgrund dieses Mechanismus waren Inhibitoren entwickelt worden, die zu den Substratmolekülen eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, trotzdem aber die Übertragung blockieren konnten. Als geeignet stellten sich die am Ribosering perjodat-oxidierten Substratmoleküle heraus (Abb. 28). Prehm (130) konnte zeigen, daß sowohl in den Membranfraktionen von B6-Zellen als auch in vivo bei B6- und HT 1080-Zellen in Gegenwart von 100 μ M bzw. 100 mM des Inhibitors die Syntheserate um 50% erniedrigt wird. Als Nachteil erwies sich, daß sie nicht nur spezifisch die Hyaluronatsynthese inhibieren, sondern gleichzeitig auch die Synthese von Heparansulfat und Chondroitinsulfat abnimmt.

Da Nukleotidzucker für die Zellmembran undurchlässig sind, werden sie durch hypoosmotische Lyse von pinozytotischen Vesikeln in die Zelle gebracht werden (131).

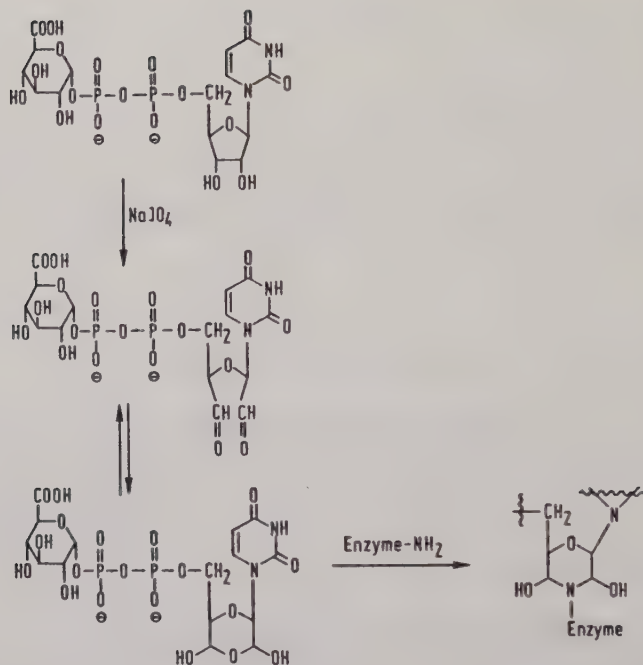


Abb. 28: Struktur von perjodat-oxidiertem UDP-GlcA. Der Ribosering wird mit NaJO_4 zum Dialdehyd oxidiert, der sich in wässriger Lösung zum cyclischen Halbacetal umlagert, welches mit freien NH_2 -Gruppen ein cyclisches Halbaminale bildet.

Die Zellen werden mit DMEM-Medium, das 10% fötales Kälberserum, 0.5 M Saccharose, 10% Polyethylenglykol 1000 und 100 mM o-UDP-GlcA enthält 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch dieses hypertone Medium diffundiert aus der Zelle das Wasser heraus. Die Zellmembran schnürt endozytotische Vesikel ab, die die Moleküle des extrazellulären Raumes in der gleichen Konzentration enthalten. Anschließend wird die Inkubationslösung verworfen und die Zellen einem hypotonen Medium ausgesetzt (DMEM : Wasser 3:2, V/V), wobei die pino-

zytotischen Vesikel platzen und der Hemmstoff in die Zelle entlassen wird (Abb. 29). Die weitere Kultivierung der Zellen erfolgt dann in normalem Medium.

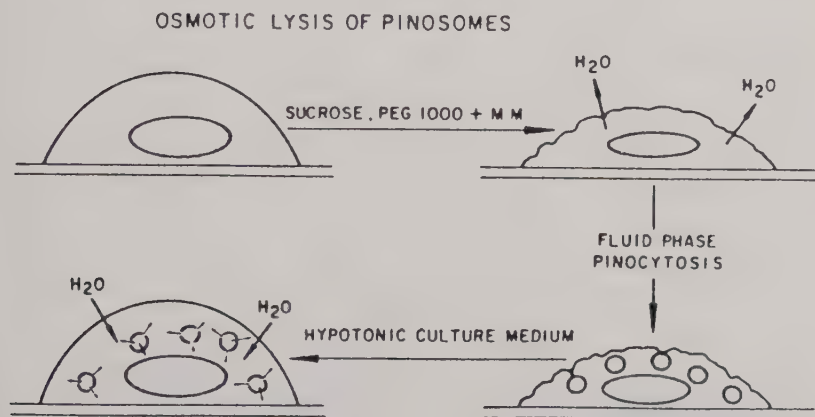


Abb. 29: Schematische Darstellung der pinozytotischen Lyse (131).

Wenn o-UDP-GlcA auf diesem Wege in unsynchronisierte Zellen gebracht wurde, so zeigte sich, daß die Zellteilung blockiert war (132). Deshalb könnte man annehmen, daß das Fehlen der Hyaluronatsynthese während des Ablösungsprozesses der Zellen in der Mitose für die Hemmung der Zellteilung verantwortlich ist.

Um diese Hypothese zu überprüfen wurden HE-Zellen mit Colchicin und Cytochalasin B über 40 Stunden synchronisiert. Nach dem Herauswaschen der Inhibitoren wurde o-UDP-GlcA zum einen nach dem Colchicin-, zum andern nach dem Cytochalasin B Block in die Zellen gebracht.

Nachdem die Zellen in normales Medium überführt worden waren, wurde nach verschiedenen Zeiten der Einbau an ³H-Thymidin bestimmt. Damit konnte entschieden werden, ob

die Zellen normal in den nächsten Zyklus übergehen.

Wurde o-UDP-GlcA nach dem Cytochalasin B Block in die Zellen gebracht, so erreichten diese, ebenso wie die Kontrollzellen, die dem pinozytotischen Medium ohne Inhibitor ausgesetzt waren, 17 - 18 Stunden später synchron die S-Phase (Abb. 30).

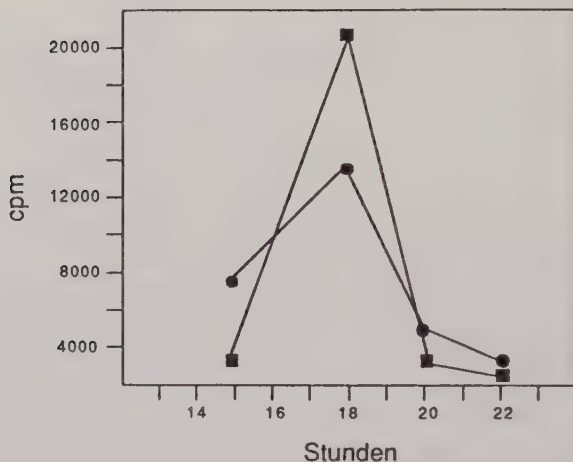


Abb. 30: Bestimmung der Synchronität von HE-Zellen durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA pro 10^6 Zellen nach der Zugabe von o-UDP-GlcA nach dem Cytochalasin B Block.

(■) Pinozytose mit o-UDP-GlcA
 (●) Pinozytose ohne o-UDP-GlcA
 Bedingungen s. Abb. 26.

Wurde der Inhibitor jedoch nach dem Colchicin Block zugegeben, d.h. nach der Metaphase, dann wurde, im Gegensatz zu den Kontrollzellen, die nächste S-Phase nicht mehr erreicht (Abb. 31). Gleichzeitig konnte damit gezeigt werden, daß die hypoosmotische Lyse von pinozytotischen Vesikeln für die Zellen nicht toxisch war.

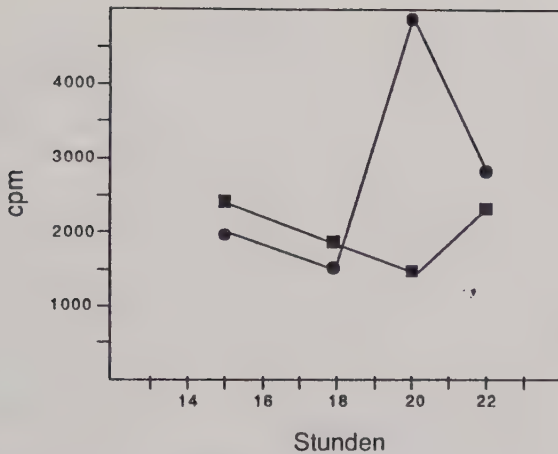


Abb. 31: Bestimmung der Synchronität von HE-Zellen durch den Einbau von ^3H -Thymidin in die DNA pro 10^6 Zellen nach der Zugabe von o-UDP-GlcA nach dem Colchicin Block.

(■) Pinozytose mit o-UDP-GlcA

(●) Pinozytose ohne o-UDP-GlcA

Bedingungen s. Abb. 26.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß die Hyaluronat-synthese für das Abrunden der Zellen und die Zellteilung nötig ist. Damit kommt Hyaluronat während der Mitose eine wichtige Rolle zu, die zwar vermutet worden war, jedoch noch nie bestätigt werden konnte.

D. DISKUSSION

Von der Hyaluronatsynthese ist bisher nur die grundlegende enzymatische Reaktion bekannt und außerdem konnte das Enzym auf der Innenseite der Plasmamembran lokalisiert werden (68,69,76,77). Über das Enzym selbst, den genauen Ablauf der Reaktion, die Abspaltung des Produkts und dessen Sekretion in den extrazellulären Raum war ebenso wenig bekannt wie über die Regulation dieses biologisch wichtigen Prozesses. Da neben der eigentlichen Synthese die Abspaltung und Sekretion des hochmolekularen Hyaluronats die entscheidenden Schritte für die Festlegung der Größe, Konzentration und Verfügbarkeit in der extrazellulären Matrix darstellen, sollten diese Vorgänge in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht werden.

Alle bisherigen Versuche den Mechanismus der Abspaltung zu klären, hatten zu keiner befriedigenden Lösung geführt. Die Möglichkeit, daß die Ketten durch Hyaluronidase abgespalten werden (104), konnte nicht bestätigt werden, da von anderen Arbeitsgruppen Hyaluronidaseaktivität weder innerhalb der Zellen noch im Medium nachgewiesen werden konnte (133). Da Hyaluronat in Lösung durch Radikale depolymerisiert werden kann (108), besteht die Hypothese, daß in vivo Hyaluronat ebenfalls durch Radikale unspezifisch abgespalten wird. Diese Vorstellung stützt sich auf den Befund, daß bei Patienten mit rheumatischer Arthritis die Viskosität der Synovialflüssigkeit vermindert ist, was auf eine Abnahme des Molekulargewichts des Hyaluronats zurückgeführt wird. Dabei wird spekuliert, daß Radikale die hochmolekularen Ketten degradieren. Bisher jedoch ist diese Hypothese noch nicht belegt.

Läßt sich die Kettenlänge des Hyaluronats beeinflussen?

Alle durchgeführten Experimente, die sowohl an Zellkulturen als auch an isolierten Plasmamembranen vorgenommen wurden, ergaben, daß die Kettenlänge des sekretierten Hyaluronats nicht durch externe Faktoren verändert werden kann. Es zeigte sich, daß die Abspaltung nicht auf einer unspezifischen Degradierung durch Radikale beruht. Weiterhin konnte kein Zusammenhang zwischen der Kettenlänge des Hyaluronats und der Aktivität der Synthase festgestellt werden. Sowohl aktivierende Substanzen wie ATP als auch eine Verlangsamung der Syntheserate durch UDP-GlcA oder Substratverdünnung veränderten nicht das Molekulargewicht des abgespaltenen Hyaluronats.

Die Abspaltung der Hyaluronatketten ist nicht vom Zellzyklus abhängig, wie es für Heparansulfat, ein anderes Glukosaminoglykan, bekannt ist, das am Ende der G_2 -Phase des Zellzyklus sekretiert wird (114). In allen Zellzyklusphasen produzieren die Zellen Hyaluronat mit identischem Molekulargewicht.

Da die Kettenlänge nicht verändert werden kann, muß man davon ausgehen, daß die Größe der Kette vom Enzym selbst bestimmt wird. Die Synthese von Molekülen einheitlicher Länge ist wichtig für ihre biologische Rolle, da nur hochmolekulares Hyaluronat auf Differenzierung und Zellwanderung Einfluß ausübt.

Kinetik des Kettenwachstums an Plasmamembranen

Die Hyaluronatsynthaseaktivität von Plasmamembranen kommt nach einer bestimmten Zeitdauer zum Stillstand, welche je nach verwendetem Zelltyp unterschiedlich ist. Die Abspaltung des Hyaluronats aus der Membran benötigt jedoch eine längere Zeitspanne (Abb. 32). Prehm (76) konnte zeigen, daß nach dem Stillstand der Synthesereaktion weder das Substrat verbraucht, noch die Hyaluronatsynthase selbst inaktiv war.

Daraus ist zu schließen, daß die Reaktion nach einer bestimmten Syntheserate einen Gleichgewichtszustand erreicht und nach außen zum Stillstand kommt. Da bei Plasmamembranen, die diesen Gleichgewichtszustand erreicht hatten, die Hyaluronatproduktion nach dem Abtrennen des Reaktionsüberstandes und der Zugabe neuer Substratlösung wieder begann (76), muß man annehmen, daß auf den Gleichgewichtszustand auch freies Hyaluronat einwirkt.

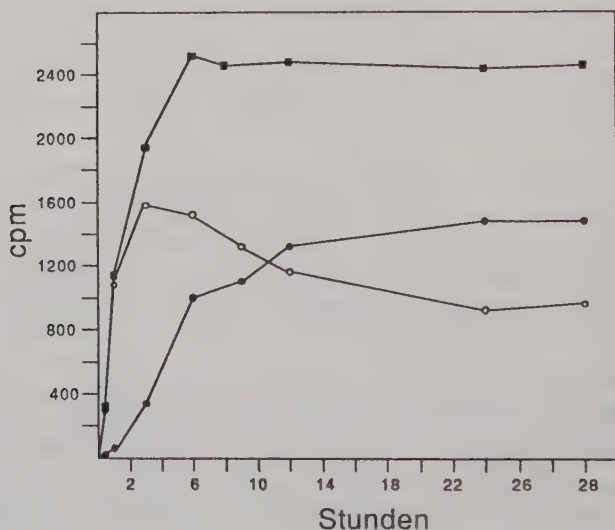
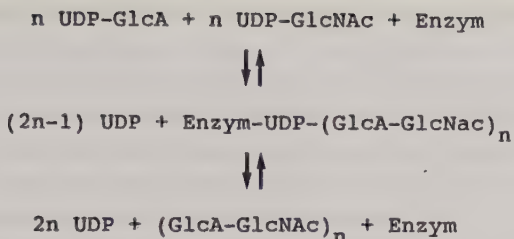


Abb. 32 Zeitliches Reaktionsprofil der Hyaluronatsynthese.
 (○) Membrangebundenes Hyaluronat,
 (●) sekretiertes Hyaluronat,
 (■) Gesamtsyntheserate.

Kann man das Gleichgewicht beeinflussen?

Betrachtet man die Reaktionsgleichung der Hyaluronatsynthese (Schema 2), dann sollten die Endprodukte der Reaktion, UDP und Hyaluronat die Syntheserate erniedrigen, wenn es sich um ein chemisches Gleichgewicht handelt.



Schema 2: Reaktionsgleichung der Hyaluronatsynthese

Versuche, das Gleichgewicht durch die Zugabe der Endprodukte (UDP, Hyaluronat) zu verschieben, führten zu keinem Ergebnis. Es wurde weder die Gesamtsyntheserate verändert, noch kam die Reaktion früher zum Stillstand. Andererseits kann die Reaktionsgleichung beeinflusst werden, wenn die Zellen vor der Bestimmung der Enzymaktivität mit Hyaluronidase behandelt werden. Aus Tab. 3 ist zu entnehmen, daß die Aktivität von B6- und 3T3-Zellen um etwa das Doppelte und die von SV3T3-Zellen auf den 10fachen Wert gegenüber den unbehandelten Zellen anstieg. Da das Endprodukt des Enzyms entfernt werden muß, um die Reaktion aus dem Gleichgewicht zu bringen, kann man daraus schließen, daß das synthetisierte Hyaluronat eine Rückkopplung auf die Synthese bewirkt.

Die Hyaluronidasebehandlung wurde an ganzen Zellen vorgenommen, um alle Faktoren, die die Hyaluronatproduktion regulieren, mit einzubeziehen, während Plasmamembranen für die Regulation wichtige Komponenten verloren haben könnten. Die Zellen wurden anschließend durch Einfrieren und Auftauen lysiert, wodurch das Enzym für die Vorläufermoleküle des Hyaluronats, UDP-GlcA und UDP-GlcNAc, zugänglich wird. Auf diese Weise kann die Enzymaktivität an Zellen direkt bestimmt werden, während die in vivo Markierung von Zellen mit $^3\text{H-GlcN}$ zu Artefakten führt, da verschiedene Zellen unterschiedliche Transportraten für Nukleotidzucker besitzen (134).

Einfluß des Hyaluronatrezeptors auf die Aktivität

Wie aber bewirkt das extrazelluläre, hyaluronidase-sensitive Hyaluronat die Rückkopplung auf das Enzym? Von mehreren Arbeitsgruppen konnte nachgewiesen werden, daß verschiedene Zelltypen Bindungsstellen für exogen zugegebenes Hyaluronat besitzen (43,105,135). Dabei zeigte sich, daß transformierte Zellen mehr ^3H -Hyaluronat binden, als die nichttransformierten Zellen und daher mehr Bindungsstellen besitzen (106). Bei den SV3T3-Zellen wurde der Hyaluronatrezeptor als 85 kd Protein isoliert und charakterisiert (43). Gebundenes Hyaluronat konnte bei ihnen sowohl durch Hyaluronidasebehandlung als auch Trypsin entfernt werden, wodurch gezeigt wurde, daß der Rezeptor ein trypsin-sensitives Protein darstellt.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde untersucht, ob ein direkter Zusammenhang zwischen Rezeptor und Hyaluronatsynthaseaktivität besteht. Daher wurde die Aktivität zwischen Zellen verglichen, die zum einen intakt von der Kulturschale abgeschabt und zum andern durch Trypsinbehandlung abgelöst wurden. Es zeigte sich (Tab. 3), daß bei SV3T3-Zellen die Einbaurate von ^{14}C -GlcA nach der Trypsinbehandlung um den 5fachen Wert erhöht war, während bei 3T3-Zellen kein Unterschied gegenüber den abgeschabten Zellen festgestellt werden konnte, da bei ihnen die perizelluläre Hülle durch Trypsin nicht zerstört wird. Diese Ergebnisse bestätigen zum einen die Anzahl der Rezeptoren, die in den beiden Zelllinien nachgewiesen wurden und zum andern die Hypothese, daß über den Rezeptor die Enzymaktivität moduliert wird.

Diese Hypothese konnte durch weitere Ergebnisse gestützt werden. Werden bei SV3T3-Zellen durch Hyaluronidasebehandlung die Rezeptorbindungsstellen freigelegt, dann bewirkt die nachfolgende Inkubation mit einer steigenden Hyaluronatmenge, daß die Einbaurate an markiertem Substrat kontinuierlich abnimmt. Über den Sättigungswert zugegebenes Hyaluronat zeigt dagegen keinen weiteren Einfluß mehr (Tab. 4).

Bindungsstudien ergaben, daß der Rezeptor eine höhere Affinität zu hochmolekularem als zu niedermolekularem Hyaluronat besitzt (44). Da die Zellen nur hochmolekulares Hyaluronat synthetisieren, kann die Regulation der Synthese auf folgenden zwei Modellen beruhen:

- 1.) Der Rezeptor bewirkt eine Hemmung der Hyaluronatsynthese, nachdem Hyaluronat gebunden ist.
- 2.) Hyaluronat selbst hemmt die Synthese, nachdem sie an den Rezeptor gebunden hat.

Die zweite Möglichkeit scheint jedoch unwahrscheinlich zu sein, da die Aktivität abnahm, wenn der Rezeptor mit Con A blockiert wurde (44) (s.C.I.2.3). Gleichzeitig unterstützt dieses Ergebnis das erste Modell, bei dem der Rezeptor nach der Bindung von Hyaluronat die Synthese inhibiert. Denkbar ist, daß dies durch eine Konformationsänderung des Rezeptors bewirkt wird, wodurch seine Affinität zur Hyaluronatsynthese verändert wird.

Für den Hyaluronatrezeptor bei SV3T3-Zellen ist nun bekannt, daß er ein integrales Membranprotein ist und mit den Aktinfilamenten assoziiert ist (136). Dies bedeutet, daß der Rezeptor durch die Zellmembran Kontakt mit dem Zellinnern besitzt. Vom EGF-Rezeptor ist bekannt, daß er durch die Bindung von EGF autophosphoryliert wird. Es wird angenommen, daß diese Phosphorylierung ein biologisches Signal darstellt, welches die mitogene Stimulierung und die Internalisierung des Hormon-Rezeptor-Komplexes bewirkt (137).

Der Hyaluronatrezeptor könnte, analog dem EGF-Rezeptor durch Bindung des Hyaluronats phosphoryliert werden und stellt dann das biologische Signal dar, das die an der Innenseite der Plasmamembran lokalisierte Hyaluronatsynthese inhibiert.

Wie aber wird das Enzym bei nichttransformierten Zellen reguliert? Frühere Bindungsstudien hatten ergeben, daß diese im Gegensatz zu ihren transformierten Varianten nur wenige

Rezeptoren besitzen (42), da exogen zugegebenes Hyaluronat das zellassozierte Hyaluronat nicht verdrängen konnte. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern gegen den Hyaluronatrezeptor konnte nun jedoch nachgewiesen werden, daß nicht-transformierte Zellen eine ähnliche oder sogar größere Anzahl von Rezeptoren besitzen als ihre transformierten Varianten (136).

Aufgrund dieser Resultate kann man davon ausgehen, daß die Regulation der Hyaluronatsynthese beider Zelltypen über den Rezeptor erfolgt. Daraus ergibt sich nun für die Bindung von Hyaluronat an den Rezeptor bei den beiden Zelllinien folgendes Modell (Abb. 33):

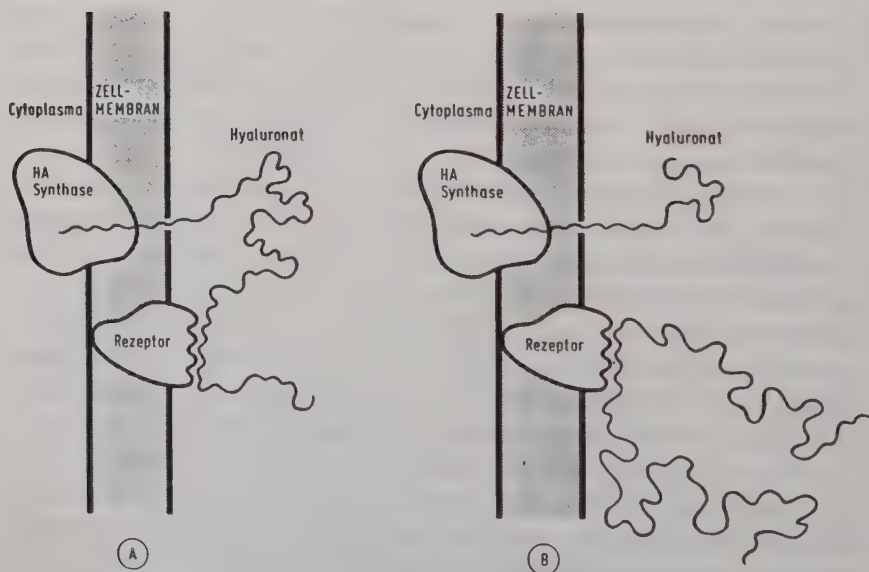


Abb. 33 Hypothetisches Modell zur Bindung von Hyaluronat an den Hyaluronatrezeptor.
a) bei nichttransformierten Zellen,
b) bei transformierten Zellen.

Transformierte und nichttransformierte Zellen besitzen eine ähnliche Anzahl von Rezeptoren. Der grundlegende Unterschied kann nun darin bestehen, daß die Rezeptoren von nichttransformierten Zellen überwiegend von Hyaluronat besetzt sind, das noch an das Enzym gebunden ist, während die Rezeptoren von transformierten Zellen durch bereits in den extrazellulären Raum sekretiertes Hyaluronat besetzt sind. Wodurch dieser Unterschied bewirkt wird, kann jedoch anhand der vorliegenden Versuche nicht erklärt werden. Eine Möglichkeit wäre, daß er auf die Transformation der Zellen zurückzuführen ist. Aufgrund dieses Unterschiedes kann erklärt werden, daß in Bindungsstudien das rezeptorgebundene Hyaluronat von nichttransformierten Zellen nicht durch exogenes Hyaluronat verdrängt werden kann und daher in früheren Versuchen bei ihnen nur wenig Rezeptoren nachgewiesen werden konnten. Wenn sowohl die 3T3-Zellen als auch die SV3T3-Zellen eine ähnliche Anzahl von Rezeptoren besitzen, dann kann nicht erklärt werden, weshalb bei den 3T3-Zellen nach der Hyaluronidasebehandlung die Enzymaktivität nicht genauso stark ansteigt wie bei den SV3T3-Zellen. Dieser Unterschied kann im Moment nur auf Veränderungen, die durch die Transformation bewirkt wurden, zurückgeführt werden.

Wo wird Hyaluronat abgespalten?

Für den Ort der Abspaltung des Hyaluronats gibt es verschiedene Möglichkeiten :

- Eine unspezifische Abspaltung innerhalb der Kette.
- Eine gezielte Abspaltung an der Außenseite der Zellmembran.
- Eine Abspaltung oder Dissoziation von der Hyaluronatsynthese an der Innenseite der Plasmamembran.

- Die Hyaluronatsynthase wird mit der fertigsynthetisierten Hyaluronatkette sekretiert.

Eine Abspaltung des Hyaluronats innerhalb der Kette kann ausgeschlossen werden, da die extrazellulären Ketten von gleichem Molekulargewicht wie die zellulären Ketten sind. Dafür spricht auch, daß bei der Abspaltung der Hyaluronatketten kein Radikalmechanismus nachgewiesen werden konnte (s.C.I.3.).

Abspaltungskinetiken von verschiedenen 'pulse-chase' markierten Hyaluronatketten lassen den Schluß zu, daß die Ketten an der Zellmembran abgespalten werden (s.C.II.3.). Durch diesen Versuch kann jedoch nicht unterschieden werden, ob die Ketten außen an der Zellmembran abgespalten werden, ob die Ketten aus dem Enzym-Produkt-Komplex dissoziieren oder ob das Enzym zusammen mit der Kette sekretiert wird.

Während der Synthese wird Hyaluronat in den Überstand sekretiert. Wenn dabei die fertige Hyaluronatkette als Enzym-Produkt-Komplex sekretiert wird, in dem das Enzym noch aktiv ist, dann sollte im Überstand bei einem Enzymassay um so mehr Aktivität nachzuweisen sein, je mehr Hyaluronat sekretiert wurde. Es konnte aber mit zunehmender Synthesedauer keine Steigerung des ^{14}C -GlCA Einbaus im Überstand festgestellt werden. Wird das Enzym dagegen inaktiv zusammen mit dem Hyaluronat sekretiert, so müßte die restliche Gesamtaktivität von Membranen, die zuvor mit Substrat inkubiert wurden, kleiner sein als von Membranen, bei denen keine Nettosynthese stattgefunden hat. Da die verbleibende Restaktivität der beiden unterschiedlich behandelten Zellen gleich war (s.C.I.6.), kann ausgeschlossen werden, daß ein Enzym-Hyaluronat-Komplex sekretiert wird.

Daher stehen nun noch folgende zwei Möglichkeiten zur Diskussion:

- Eine Abspaltung an der Außenseite der Plasmamembran.

- Eine Abspaltung bzw. Dissoziation von der Hyaluronatsynthase.

Die Ergebnisse lassen jedoch keine Aussage zu, welche Möglichkeit zutrifft. Eine exakte Lösung wäre möglich, wenn nach dem Kettenabbruch restliche Radioaktivität in der Membran nachgewiesen werden könnte. Dazu reicht aber die verfügbare Menge des ^{14}C -GlcA markierten Hyaluronats in der Membran nicht aus. Zur endgültigen Klärung bedarf es Versuche, die mit dem reinen, aktiven Enzym durchgeführt werden sollten. Dann kann geklärt werden, ob zur Abspaltung ein zweites unabhängiges Protein nötig ist, oder ob das Enzym sowohl die Synthese als auch die Abspaltung reguliert.

Hyaluronatsynthaseaktivität in Gegenwart von ATP

Der Einfluß von ATP auf die Enzymaktivität kann nur an Plasmamembranen untersucht werden, da intakte Zellmembranen kein Transportsystem für Nukleotidzucker besitzen. Es zeigte sich, daß ATP sowohl aktivierend als auch inhibierend auf die Hyaluronatsynthese wirken kann, je nachdem welcher Zelltyp verwendet wurde. Dieser widersprüchliche Effekt kann auf einer unterschiedlichen Regulation des Enzyms bei verschiedenen Zelllinien beruhen.

Für eine Aktivierung des Enzyms durch ATP lassen sich folgende Hypothesen aufstellen:

- a) ATP stimuliert die Synthese durch eine Phosphorylierung des Enzyms.
- b) ATP bindet spezifisch an das Enzym und aktiviert dadurch die Synthese.
- c) ATP hemmt Phosphatasen, die UDP-GlcA und UDP-GlcNAc degradieren können.

Eine Phosphorylierung des Enzyms durch ATP konnte ausgeschlossen werden. Wurde anstelle von ATP sein Analogon AMP-PCP, das Phosphorylierungsreaktionen verhindert, eingesetzt, dann erniedrigte sich die Aktivität nicht wie erwartet auf den Kontrollwert, sondern stieg noch über den mit ATP erreichten Wert an (Abb. 19).

Eine spezifische Bindung von ATP an das Enzym konnte nicht bewiesen werden. Sowohl durch AMP als auch durch ADP wurde bei gleicher Konzentration ein zu ATP identisches Aktivitätsprofil erhalten (s.C.II.6.). Da auch andere phosphorylierte Substanzen wie Triphosphat (P_3) oder Diadenosintetraphosphat (Ap_4A) die Hyaluronatsynthase aktivieren (138), ist es unwahrscheinlich, daß ATP einen spezifischen Einfluß auf das Enzym ausübt.

Da in allen Zelllinien Phosphatasen vorhanden sind, ist es möglich, daß die Erhöhung der Syntheserate in Gegenwart von phosphorylierten Substanzen auf einer Inhibition der Phosphatasen beruht. Dadurch wird verhindert, daß die Substratkonzentration durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung unter den K_m -Wert des Enzyms abfällt. Zudem entspricht die physiologische ATP-Konzentration mit etwa 3 mM (139) der ATP-Konzentration, die eine maximale Stimulierung des Enzyms verursacht.

Nach neuesten Ergebnissen ist die Aktivierung der Hyaluronatsynthase durch phosphorylierte Substanzen jedoch nicht auf eine erhöhte Hyaluronatproduktion zurückzuführen, sondern auf andere, noch unbekannte Enzyme, die ^{14}C -GlcA aus UDP-GlcA in Gegenwart dieser Substanzen auf ebenfalls noch unbekannte Produkte übertragen können (140).

Bei B6-Membranen sind solche Enzyme vermutlich nicht vorhanden, weshalb ATP nur einen inhibierenden Effekt bewirkt. Die Inhibition beruht nicht auf einer Erniedrigung der Mg^{2+} -Ionen Konzentration infolge einer Komplexierung durch ATP, da in Gegenwart von ATP im Enzymassay die Mg^{2+} -Konzentration erhöht wurde. Daher bewirkt ATP wahrscheinlich eine Hemmung indem es das aktive Zentrum des Enzyms unspezifisch blockiert und nur durch Konkurrenz daraus verdrängt

werden kann.

Hyaluronatsynthese während der Mitose

Bestimmt man die Hyaluronatsyntheserate von unsynchronisierten HE-Zellen über einen Zeitraum von 40 Stunden, so steigt die produzierte Hyaluronatmenge sowohl im Medium als auch an der Zelle kontinuierlich an (Abb. 23b). Im Gegensatz dazu ist eine dramatische Veränderung zu erkennen, wenn die Zellen mit den beiden Inhibitoren Colchicin und Cytochalasin B synchronisiert werden. Colchicin wirkt in der Metaphase der Mitose durch Anlagerung an die Mikrotubuli, während Cytochalasin B durch Zerstörung der Aktinfilamente wirksam wird (116). Dabei zeigte sich, daß während des Colchicin Blocks die Menge an zellgebundenem Hyaluronat kontinuierlich anstieg, während im Medium nur wenig nachgewiesen werden konnte (Abb. 24b). Ein extremer Anstieg des zellulären Hyaluronats nach dem Herauswaschen des Inhibitors ist verbunden mit dem Übergang von der Metaphase zur Cytokinese. Der gleiche extreme Anstieg der Hyaluronatsynthese konnte beobachtet werden, wenn die Zellen mit Cytochalasin B arretiert wurden. Durch das Herauswaschen des Inhibitors können die Zellen in die G_1 -Phase übergehen, wobei die Syntheserate sprunghaft wieder auf den Kontrollwert der unbehandelten Zellen abfiel (Abb. 25b). Zum gleichen Resultat führte das *in vitro* durchgeführte Experiment. Dadurch kann ausgeschlossen werden, daß die erhöhte Hyaluronatproduktion auf durch die Inhibitoren hervorgerufenen Artefakten beruht.

Im Gegensatz zur Hyaluronatsynthese war die Menge an synthetisiertem Heparansulfat und Chondroitinsulfat niedrig und wurde nur unwesentlich durch die Inhibitoren verändert (Tab. 8). Während in der Metaphase die Zellen noch fest am Substrat anhaften, runden sie sich in der Cytokinese ab und sind nur mehr lose daran gebunden. Zum gleichen Zeitpunkt steigt auch die Hyaluronatsynthese extrem an. Deshalb könnte die Hyaluronatsynthese für das Ablösen der Zellen vom Sub-

strat und deren Abrunden nötig sein.

Wenn die Hyaluronatsynthese vor der Cytokinese durch o-UDP-GlcA gehemmt wurde, dann war die Zellteilung blockiert (Abb. 31). Diese Ergebnisse beweisen, daß Hyaluronat für die Ablösung der Zellen während der Mitose verantwortlich ist.

Bisher gab es viele Hinweise, daß Hyaluronat in Zusammenhang mit der Anhaftung der Zellen steht. So synthetisieren stark anhaftende Zellen wenig Hyaluronat (141), während nur lose anhaftende Zellen viel Hyaluronat produzieren (142). In Gegenwart von hyaluronat-bindenden Proteinen verringert exogen zugegebenes Hyaluronat das Ausbreiten der Zellen und erhöht gleichzeitig die Zellbeweglichkeit (143).

Noch zu klären ist, wie die Hyaluronatsynthase aktiviert wird. Da der Hyaluronatrezeptor mit Aktin assoziiert ist, könnten Veränderungen am Cytoskelett während der Mitose die Aktivivierung auslösen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

Aufgabe dieser Dissertation war es, den Abspaltungsmechanismus des Hyaluronats vom Enzym und die Sekretion der Ketten in den extrazellulären Raum zu klären. Die Abspaltung läßt sich folgendermaßen erklären:

- a) Sie basiert nicht auf einer unspezifischen Degradierung durch Radikale.
- b) Die Größe der Hyaluronatkette ist unabhängig vom Zellzyklus.
- c) Die Kettenlänge des abgespaltenen Hyaluronats ist unabhängig von Aktivatoren und Inhibitoren, sowie von der Wachstumsphase der Zellen.
- d) Hyaluronat wird an der Plasmamembran abgespalten.

Die Untersuchung der Regulation der Hyaluronatsynthese ergab folgende wesentliche Merkmale:

- 1.) Die Aktivität des Enzyms konnte bei HT 1080-Zellen durch Adenosinnukleotide sowie durch AMP-PCP gesteigert werden, wobei sich gleichzeitig die Zeitdauer der aktiven Synthese erhöhte.
- 2.) Die Degradierung des zellgebundenen Hyaluronats durch Hyaluronidase führte zu einer extremen Aktivitätssteigerung bei allen untersuchten Zelllinien. Bei den SV3T3-Zellen spielt der bei ihnen charakterisierte Hyaluronatrezeptor eine bedeutende Rolle bei der Regulation des Enzyms.
- 3.) Während der Metaphase und der Cytokinese stieg die Syntheserate stark an. Gleichzeitig konnte durch Hemmung

der Synthese mit Perjodat-oxidiertem UDP-GlcA nach der Metaphase die Zellteilung verhindert werden. Daher ist die Hyaluronatsynthese verantwortlich für die Ablösung der Zellen vom Substrat und für die Zellteilung selbst.

F. ABKÜRZUNGEN

ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
CHAPSO	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonio]- 2-hydroxy-1-propansulfat
Ci	Curie
Con A	Concanavalin A
CPC	Cetylpyridiniumchlorid
cpm	Counts pro Minute
DEAE	Diethylaminoethan
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FITC	Fluoreszinoisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GlcN	N-Acetylglukosamin
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hyaluronsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin- N'-2'-ethansulfonsäure
kd	Kilodalton
Min.	Minuten
n.n.	nicht nachgewiesen
NZS	normales Ziegenserum
OD	optische Dichte
o-UDP-GlcA	perjodat-oxidierte Uridindiphospho- glukuronsäure
PAP	Peroxidase-anti-Peroxidase
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglykol
PPO	2,5-Diphenyloxazol
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat

Sek.	Sekunden
Std.	Stunden
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
UDP-GlcA	Uridindiphosphoglukuronsäure
UDP-GlcNAc	Uridindiphospho-N-acetylglukosamin
V_t	Ausschlußvolumen

G. MATERIALIEN UND METHODEN

1. Materialien

Chemikalien

Soweit nicht anders aufgeführt, wurden alle Laborchemikalien von Merck bezogen.

Polyethylenglykol 6000, Glukuronolacton, Mannitol, Superoxiddismutase, Freund'sches Adjuvans, UDP-GlcNAc, 3,3'-Diaminobenzidin, Cardiolipin, Cycloheximid, Colchicin, Cytochalasin B, Concanavalin A, Hyaluronsäure von Sigma.

UDP-GlcA, AMP-PCP, AMP, ADP, ATP von Boehringer Mannheim.

Triton X-100, 2-Mercaptoethanol, Rotiszint von Roth.

Glycin, Glycerin, Essigsäure, Chloroform, Silbernitrat von Riedel de Haen.

25% Glutaraldehyd, DTT, Acrylamid, Bisacrylamid, Bromphenolblau, SDS von Serva.

o-UDP-GlcA wurde von Herrn Dr. P. Prehm zur Verfügung gestellt.

Antikörper

FITC-gekoppeltes anti-Kaninchen IgG, anti-Kaninchen IgG, Peroxidase-anti-Peroxidase von Sigma.

Enzyme

Protease Typ XIV, Trypsin von Sigma.

Hyaluronidase aus Streptomyces Hyalurolyticus (100 U/ml) von Seikagum.

Radioaktive Substanzen

L-³⁵S-Methionin (> 1000 Ci/mmol) Amersham

Na¹²⁵J (1 mCi/ml) Amersham

D-[6-³H]-Glukosaminhydrochlorid (20 - 40 Ci/mmol) Amersham

¹⁴C-UDP-GlcA (>180 mCi/mmol) NEN

[6-³H]-Thymidin (20 - 30 Ci/mmol) Amersham

Medien und Medienzusätze

DMEM, FKS, Penicillin, Streptomycin, Kanamycin von Gibco.

Nystatin von Sigma.

Todd-Hewitt Medium von Difco.

Säulenmaterialien

Affi-Gel 10 von Bio-Rad.

Sephacryl S-1000, DEAE-Sephacel von Pharmacia.

Sonstiges

Nitrozellulose, Protein-Assay-Lösung von Bio-Rad. Zur Vereinfachung wurde im Text bidestilliertes Wasser kurz Wasser genannt.

2. Methoden

2.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zelllinien wurden als Monolayerkulturen bei 37°C, mit 5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit gezüchtet. B6-Zellen wurden unter den gleichen Bedingungen als Suspensionskultur gehalten. Als Medium wurde 'Dulbecco's modified Eagle medium' (DMEM), mit 5% FKS, 1 U/ml Streptomycin, 1 U/ml Penicillin, 1 U/ml Kanamycin und 5 µg/ml Nystatin verwendet. Konfluente Kulturen wurden mit 0.25% Trypsin, 0.5% EDTA in PBS abgelöst. Normale Zellen wurden maximal bis zu einer Verdünnung von 1:4 weiterpassagiert, während die transformierten Zellen bis zu 1:10 verdünnt wurden.

Nicht benötigte Zellen wurden trypsiniert, bei 1200 rpm 8 Minuten abzentrifugiert, mit PBS (8 g NaCl, 0.2 g KCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄ pro Liter pH 7.2 - 7.4) gewaschen, im Einfriermedium (10% DMSO, 15% FKS in DMEM) abzentrifugiert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren. Dabei wurden eine 75 cm² konfluente Kulturschale in 1 ml Einfriermedium aufgenommen.

2.1.1 Markierung von Zellen

2.1.1.1 Markierung des Hyaluronats mit ³H-Glukosamin

Normale Zellen wurden 1:2, transformierte Zellen 1:3 passagiert und zum Medium 5 µCi/ml ³H-GlcN zugesetzt. Wenn in den einzelnen Versuchen nicht anders aufgeführt, wurden die Zellen nach 24stündiger Inkubation aufgearbeitet.

2.1.1.2 Markierung von Proteinen mit ³⁵S-Methionin

B6-Zellen wurden in 40 ml serum- und methionin-freiem Medium unter Zusatz von 5 µCi/ml ³⁵S-Methionin 48 Stunden

kultiviert. Die Zellen wurden in 8 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Medium wurde lyophilisiert, in wenig PBS aufgenommen, 48 Stunden gegen PBS dialysiert, auf 100 µl eingeeengt und auf das Vorhandensein des 52 kd Proteins untersucht.

2.1.1.3 Markierung der DNA mit ^3H -Thymidin

Mit dieser Methode wird die Einbaurrate von ^3H -Thymidin in die DNA während der S-Phase des Zellzyklus bestimmt (128), woraus die Synchronität der Zellen zu ersehen ist.

HE-Zellen (3×10^5 Zellen/ml) wurden in 25 cm² Kulturschalen in 5 ml Medium kultiviert. 30 Minuten vor dem Trypsinieren wurden sie mit 0.5 µCi/ml ^3H -Thymidin versetzt. Nach dem Ernten wurden die Zellen in 1 ml Phosphatpuffer pH 6.8 aufgenommen und durch Einfrieren und Auftauen aufgebrochen. Die DNA wurde mit 4 ml 30% Trichloressigsäure gefällt (15 Minuten, 0°C) und bei 2000 rpm 5 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml kalter 30% Trichloressigsäure resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der DNA-Niederschlag wurde in Szintillationsflüssigkeit aufgenommen und die eingebaute Radioaktivität im β -Counter bestimmt.

2.1.2 Kokultivierungen

B6-Zellen wurden mit einer Dichte von 4×10^5 /ml in 75 cm² Kulturschalen in 20 ml Medium ausgesät. Dazu wurden B16F10-Zellen mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml zugegeben.

HE-Zellen und B16F10-Zellen wurden jeweils mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml kokultiviert.

Unter Zusatz von 5 µCi/ml ^3H -GlcN wurden die Zellen bis zur Konfluenz belassen.

2.1.2.1 Zugabe von Radikalfängern

In einigen Versuchen wurde zu den Kokultivierungen 1-12

$\mu\text{g/ml}$ Medium Tocopherolsuccinat (Stammlösungen: 1 mg/ml in Ethanol; 10 mg/ml in Ethanol) oder 100 mM Mannitol zugesetzt und wie unter G.2.1.2 beschrieben kultiviert.

2.1.3 Blockierung des Hyaluronatrezeptors bei SV3T3-Zellen

2.1.3.1 Mit Hyaluronat

Konfluente 75 cm^2 Kulturschalen mit SV3T3-Zellen wurden mit einem Gummiwischer abgeschabt und die Zellzahl in der Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in 1 ml Phosphatpuffer aufgenommen und mit 10 U Hyaluronidase 30 Minuten bei 37°C behandelt. Anschließend wurden sie 3 mal mit dem Puffer gewaschen und mit 3, 6, 9 und 120 μg Hyaluronat versetzt. Die einzelnen Proben wurden mit Phosphatpuffer auf 100 μl aufgefüllt und eine Stunde bei 37°C inkubiert.

2.1.3.2 Mit Concanavalin A

6×10^6 Zellen wurden in 75 cm^2 Kulturschalen in 20 ml Medium ausgesät. Nach 3 Stunden wurden 20 $\mu\text{g/ml}$ Con A und 5 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-GlcN}$ zugesetzt und 24 Stunden kultiviert.

2.1.4 Arretierung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusphasen

Zur Untersuchung der Kettenlänge während der einzelnen Stadien des Zellzyklus wurden HE-Zellen mit einer Zelldichte von $1 \times 10^5/\text{ml}$ in 20 ml Medium unter Zusatz von 5 $\mu\text{Ci/ml}$ $^3\text{H-GlcN}$ und den einzelnen Inhibitoren verwendet und bis zur Konfluenz inkubiert.

Bei der Bestimmung der Hyaluronatsynthaseaktivität während der Mitose wurden 5×10^5 HE-Zellen in 25 cm^2 Kulturschalen in 5 ml Medium jeweils 15 Stunden mit $^3\text{H-GlcN}$ vorinkubiert und anschließend die Inhibitoren zugesetzt. Die

Zeitkinetiken sind aus den Ergebnissen zu ersehen.

Die Inhibitoren wurden in folgenden Konzentrationen zugegeben: Hydroxyharnstoff 50 $\mu\text{g/ml}$, Cycloheximid 0.05 $\mu\text{g/ml}$, Cytochalasin B 2 $\mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 5 mg/ml in DMSO), Colchicin 0.01 $\mu\text{g/ml}$ (Stammlösung 20 $\mu\text{g/ml}$ in Ethanol).

2.1.5 Pinozytotische Lyse von Zellen

Die in 25 cm^2 Kulturschalen kultivierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml DMEM, das anstelle von Carbonat mit 2.4 g/l HEPES gepuffert war und das zusätzlich 10% FKS, 0.5 M Saccharose, 10% Polyethylenglykol 1000 und 100 mM perjodat-oxidierte UDP-GlcA enthielt, 8 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Lösung wurde verworfen und die Zellen 2 Minuten bei 37°C mit einer Mischung aus DMEM / Wasser (3:2, V/V) inkubiert. Diese Prozedur wurde wiederholt. Die Weiterkultivierung der Zellen erfolgte dann in normalem Medium.

2.1.6 In vitro Aktivitätsbestimmung von Zellen

Die Zellen wurden bis zur Konfluenz kultiviert, von der Kulturschale abgelöst und in PBS 8 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100 μl PBS aufgenommen und in Aceton/Trockeneis oder flüssigem Stickstoff eingefroren. Durch das Auftauen bei 37°C wurden die Zellen aufgebrochen und anschließend mit Substratlösung inkubiert.

Das Ablösen der Zellen von der Kulturschale erfolgte in einigen Experimenten mit Trypsin, überwiegend aber wurden die Zellen mit einem Gummiwischer abgeschabt. In einigen Versuchen wurden die abgeschabten Zellen vor dem Einfrieren 30 Minuten bei 37°C mit 0.5 U Hyaluronidase behandelt.

2.1.7 Isolierung von Hyaluronat aus Zellen

2.1.7.1 Aus dem Medium

Das Medium der mit ^3H -GlcN markierten Zellen wurde abdekantiert. Die Fällung des Hyaluronats erfolgte durch Zugabe des 5fachen Volumens 70% Ethanol 1 Stunde bei Raumtemperatur. Das Präzipitat wurde 10 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Der Niederschlag wurde in 10 ml PBS resuspendiert und 1 mg/ml Protease zugesetzt. Der Proteinverdau wurde über Nacht bei 37°C durchgeführt. Die Lösung wurde anschließend lyophilisiert.

2.1.7.2 Aus den Zellen

Die Zellen wurden mit Trypsinlösung von der Matrix abgelöst und 8 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit PBS gewaschen. Die Resuspension erfolgte in 10 ml PBS. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 $\mu\text{l/ml}$ Emulphogen lysiert und anschließend 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Nach dem Erkalten wurde 1 mg/ml Protease zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2 Fermentierung von Streptokokken

Mit einer 10 ml Übernachtskultur wurde 1 l autoklaviertes Todd-Hewitt Medium (30 g/l) angeimpft. Nachdem ein OD_{600} von 0.5 - 0.6 erreicht war, wurden damit 10 - 30 l Medium angeimpft. Die Aufzucht erfolgte in einem Fermenter der Fa. New Brunswick Scientific Co., Inc. bei 37°C unter ständigem Rühren (144). Der OD_{600} , sowie der pH-Wert des Medium wurden stündlich gemessen. Fiel der pH unter 7, so wurde das Medium mit 10 n NaOH neutralisiert. Die Streptokokken wurden kultiviert, bis die stationäre Phase erreicht wurde, was meistens einem OD_{600} von 0.8 entsprach. Die Kulturen wurden danach auf Eis gestellt und zur Darstellung von Protoblastenmem-

branen verwendet (s.G.2:3.3).

Zur Bestimmung der Kettenlänge des Hyaluronats aus Streptokokken in vivo wurden 200 ml Kulturen gezogen. Die Anfärbung der aus Hyaluronat bestehenden Kapsel erfolgte durch Auftüpfeln eines Tropfens Streptokokkenlösung auf einen Objektträger. Dazu wurden 20 μ l Tuschelösung gegeben und mit einem Deckgläschen bedeckt.

2.2.1 Isolierung von Hyaluronat aus Streptokokken

2.2.1.1 Zelluläres Hyaluronat

Die Bakterien wurden 20 Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit PBS gewaschen. Die Streptokokken wurden in 16 ml 1% Triton X-100 in PBS suspendiert, 30 Minuten auf Eis gestellt und noch 15 Minuten bei Raumtemperatur belassen, um die Hyaluronatkapsel abzulösen. Nichtsolubilisierete Bestandteile wurden 15 Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert. Zum Überstand wurden 5 ml CHCl_3 /Isoamylalkohol (5:1, V/V) gegeben und die Lösung vorsichtig geschüttelt. Zur besseren Phasentrennung wurde die Lösung 10 Minuten bei 2000 rpm zentrifugiert und die organische Phase verworfen. Diese Extraktion der wässrigen Phase wurde wiederholt.

Zur Molekulargewichtsbestimmung von mit ^3H -GlcN markierten Streptokokken wurde diese Lösung 24 Stunden gegen Wasser dialysiert und anschließend auf 1 ml eingeeengt. Ein Aliquot davon wurde zur Gelfiltration verwendet.

Für die viskosimetrische Messung erfolgte die Dialyse gegen PBS.

2.2.1.2 Extrazelluläres Hyaluronat

Die Aufarbeitung erfolgte analog zu G.2.1.7.1. Für die viskosimetrische Messung wurde die Lösung nach dem Proteaseverdau gegen PBS dialysiert.

2.3 Darstellung von Plasmamembranen

2.3.1 Darstellung von B6-Membranen

Konfluente B6-Zellen wurden 4 - 6 Stunden bevor sie geerntet wurden, durch Zugabe von zusätzlichen 5% FKS stimuliert. Die Zellen wurden 20 Minuten bei 2000 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde bei 4°C mit PBS gewaschen. Nach der Resuspension in 30 ml kaltem PBS wurden die Zellen in der Parr-Bombe in 30 Minuten bei 750 psi (50 atm) aufgebrochen (145). Zellkerne und große Zelltrümmer wurden 10 Minuten bei 800 rpm abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die partikuläre Fraktion durch 20minütiges Zentrifugieren bei 10000 rpm gewonnen. Das Pellet wurde in Phosphatpuffer pH 6.8 mit 5 - 7 mg Protein/ml suspendiert. Die Proteinbestimmung erfolgte entweder nach Bradford (146) oder nach Lowry (147).

2.3.2 Darstellung von Plasmamembranen nach der Zweiphasenmethode (119)

Das Medium konfluenter Kulturschalen wurde abgeschüttet und die Zellen mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden in PBS mit einem Gummiwischer abgeschabt und anschließend 10 Minuten bei 1200 rpm abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 30 ml PBS resuspendiert und die Zellen durch 100 Hübe im Dounce Homogenisator aufgebrochen. Nach dem Abzentrifugieren der schweren Zellbestandteile wurde die partikuläre Fraktion aus dem Überstand durch 20minütiges Zentrifugieren bei 10000 rpm gewonnen. Das Pellet wurde in 10 ml Oberphase (Polyethylenglykol 6000) homogenisiert und die Lösung mit 10 ml der Unterphase (Dextran T 500) vermischt. Die reine Plasmamembran sammelte sich nach 10minütiger Zentrifugation bei 8000 rpm an der Phasengrenze. Die Plasmamembran wurde mit Phosphatpuffer pH 6.8 gewaschen und darin mit 5 mg Protein/ml aufgenommen.

2.3.3 Darstellung von Protoblastenmembranen aus Streptokokken

Die Isolierung der Protoblastenmembran erfolgte nach der Methode von Sugahara et al. (72). Die wie in G.2.2 beschrieben kultivierten Streptokokken wurden 20 Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde das Bakterienpellet in 200 ml PBS suspendiert und in einer Kühlrosette bei 4°C 4 mal 3 Minuten in 5 Minuten Intervallen bei 120 W Ultraschall behandelt. Das Homogenat wurde 20 Minuten bei 9000 rpm zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Protoblastenmembran im Ti 50 Rotor bei 120000 g in 60 Minuten abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 mM Phosphatpuffer pH 6.8 durch Ultraschallbehandlung suspendiert und erneut zentrifugiert. Die Membranen wurden anschließend mit einer Proteinkonzentration von 5 - 10 mg/ml in 40 mM Phosphatpuffer suspendiert.

Alle hergestellten Membranen wurden bis zu ihrer Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.4 In vitro Enzymassay

Die in G.2.3 erhaltenen Membranen wurden mit der gewünschten Proteinmenge in 50 - 70 µl 40 mM Phosphatpuffer pH 6.8 suspendiert. Dazu wurde das gleiche Volumen Substratlösung (8 µM UDP-¹⁴C-GlcA, 166 µM UDP-GlcNAc, 4 mM DTT, 20 mM MgCl₂ in 40 mM Phosphatpuffer pH 6.8) zugesetzt (148) und wenn nicht anders angeführt, 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1% SDS (Endkonzentration) gestoppt.

2.4.1 Absteigende Papierchromatographie

Die Abtrennung des markierten Hyaluronats von der Substratlösung erfolgte durch absteigende Papierchromatographie. Die inkubierten Proben wurden auf Whatman 3MM

Papier aufgetragen, der Startfleck mit Bleistift markiert und 24 Stunden mit Ethanol/1M Ammoniumacetat (13:7, V/V) pH 5.5 als Laufmittel eluiert. In den meisten Fällen wurden Überstände und Membranen getrennt aufgetragen. Die Membranen wurden vorsichtig mit 1% SDS-Lösung solubilisiert. Die markierten Startpunkte wurden ausgeschnitten, in Szintillationsflüssigkeit gegeben und die eingebaute Radioaktivität bestimmt.

2.5 Ionenaustauscherchromatographie

Als Säulenmaterial wurde DEAE-Sephacel mit einer Naßpartikelgröße von 40 - 150 μm verwendet. Die Säule (20 x 1 cm) wurde 5 cm hoch mit bereits vorgequollenem Säulenmaterial bepackt und mit 2 ml 1 M Tris pH 8.4 und 20 ml 10 mM Tris pH 6.8 äquilibriert. Die Ionenstärke der zellulären und extrazellulären Hyaluronatpräparationen (s.G.2.1.8, G.2.2.1) wurde durch Zugabe von 10 mM Tris pH 8.4 eingestellt. Diese Lösung wurde auf die Säule aufgetragen und mit 2 Säulenvolumen 10 mM Tris gewaschen. Eluiert wurde mit einem linearen 50 ml Gradienten von 0 - 0.6 M NaCl (149). Pro Fraktion wurden in einem ABIMED Minikollektor 40 Tropfen gesammelt. Die Molarität der Fraktionen wurde durch Messung der Leitfähigkeit bestimmt. Mit jeweils 50 μl Aliquots jeder Fraktion wurde deren Radioaktivität gemessen. Die Gesamtmenge des Hyaluronats ergab sich aus der Summe der cpm des Maximums, das bei 0.3 M NaCl eluierte, nach Subtraktion des Hintergrunds.

Sollte das Molekulargewicht des Hyaluronats bestimmt werden, dann wurden diese Fraktionen gesammelt und lyophilisiert.

2.6 Bestimmung der Kettenlänge durch Gelfiltration

Als Säulenmaterial wurde Sephacryl S-1000 (Pharmacia)

verwendet. Es wurde in 0.1% SDS in PBS aufgeschlämmt, an der Wasserstrahlpumpe entgast und anschließend damit eine 50 x 0.8 cm Säule bepackt. Mit der gleichen Lösung wurde die Säule über Nacht äquilibriert. Jeweils 150 μ l der aufzutrennenden Probe wurden abzentrifugiert und nach Zugabe von 10 μ l Substratlösung, zur Bestimmung von V_t , auf die Säule aufgetragen. Eluiert wurde mit 0.1% SDS in PBS. Die Fraktionengröße wurde über die Zeit bestimmt und betrug 200 - 300 μ l. Der Einbau an Radioaktivität jeder Fraktion wurde bestimmt. Um die einzelnen Elutionsprofile miteinander vergleichen zu können, wurde jeder Lauf auf einen V_t -Wert von 12.56 ml abgeglichen, indem durch Division des jeweiligen V_t -Wertes ein Faktor erhalten wurde, mit dem die einzelnen Fraktionengrößen multipliziert wurden.

2.7 Glukuronsäurebestimmung nach Bitter und Muir (101)

Die in G.2.2.1 erhaltenen Proben wurden auf ihren Hyaluronatgehalt untersucht. Dazu wurden 3 ml 0.025 M Natriumtetraborat x 10 H_2O in konzentrierter Schwefelsäure auf 4°C gekühlt. Diese Lösung wurde mit 0.5 ml der Probe überschichtet und durch vorsichtiges Schütteln miteinander vermischt, damit 20 - 30 °C nie überschritten wurde. Erst nach vollständiger Mischung wurde die Lösung gevortext. Die verschlossenen Proben wurden dann 10 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt und auf Raumtemperatur abgekühlt. Zur Bildung des Farbkomplexes wurde 0.1 ml 0.125% Carbazol in absolutem Ethanol zugegeben, kräftig geschüttelt und weitere 15 Minuten im kochenden Wasserbad erhitzt. Die OD_{530} wurde in einer 1 ml Küvette bestimmt. Als Standard wurde Glukuronolacton mit einer Konzentration 10 - 40 μ g/ml verwendet.

2.8 Fällung von Hyaluronat durch CPC

Hyaluronat wurde aus einer 40 mM Phosphatlösung durch Zugabe von 1% CPC (Endkonzentration) gefällt. Damit die Fällung vollständig war, wurde zusätzlich 200 µg Hyaluronat als Carrier eingesetzt. Die Präzipitation wurde 1 Stunde bei 37°C durchgeführt. Der Niederschlag wurde 5 Minuten bei 10000 g in der Eppendorffzentrifuge abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde durch Zugabe von 10% Natriumacetat in Methanol gelöst (150) und zur Gelelektrophorese verwendet.

2.9 Darstellung von Liposomen

Die Darstellung der Liposomen erfolgte nach Triscott und van de Rijn (4). Das in Ethanol gelöste Cardiolipin wurde zur Trockene einrotiert und mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 0.45% CHAPSO in PBS so lange Ultraschall behandelt, bis eine homogene Suspension entstand. Zur Proteinklösung wurde das gleiche Volumen an Phospholipidlösung zugegeben. Die Liposomen wurden entweder nach der Verdünnungsmethode (151), indem die Lösung mit dem 30fachen Volumen PBS verdünnt und die Liposomen 30 Minuten bei 40000 rpm im Ti 50 Rotor abzentrifugiert wurden, oder durch 48stündige Dialyse (152) hergestellt.

2.10 Jodierung von B6-Membranen

Als Methode wurde die Jodierung von kleinen Mengen Protein in Gegenwart eines Überschusses von Lipiden verwendet (118). Von B6-Membranen wurden 50 µg Protein in 100 µl Phosphatpuffer pH 6.8 mit 100 µl 1 M Glycinpuffer pH 10 vermischt und 0.5 mCi Na¹²⁵J in 100 µl 1 M Glycinpuffer pH 10 zugegeben. Die Jodierung erfolgte durch Zugabe von 100 µl JCl-Lösung. Die Stammlösung von JCl wurde hergestellt, indem 0.56 g KJ, 0.33 g NaJO₃, 29.2 g NaCl, 21 ml konz. HCl mit

Wasser auf 250 ml verdünnt wurden. Vor dem Benutzen der Lösung wurde entstandenes J_2 aus 1 ml JCl-Stammlösung durch mehrmaliges Extrahieren mit CCl_4 entfernt. Restliches CCl_4 wurde aus der Lösung durch wassergesättigte Pressluft vertrieben. 100 μ l dieser gereinigten Stammlösung wurden mit 1 ml 2 M NaCl vermischt und zur Reaktion eingesetzt.

Die Reaktion wurde nach 10 Sekunden gestoppt, indem die Plasmamembran 5 Minuten bei 10000 g abzentrifugiert wurde. Die Membran wurde anschließend in 100 μ l unmarkierter Substratlösung suspendiert und 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Membranen wurden abgetrennt und aus dem Überstand Hyaluronat durch CPC gefällt. Dieses Präzipitat wurde auf sein Proteinmuster untersucht.

2.11 SDS-Elektrophorese

Der Nachweis von Proteinen erfolgte mit der Flachgelelektrophorese (153). Dabei wurden routinemäßig 10% Trenngele und 4% Sammelgele mit jeweils 0.8% Bisacrylamid verwendet.

Die Proben wurden mit 3fach Probenpuffer, dem zur Reduktion 10% Mercaptoethanol zugesetzt war, verdünnt und 5 Minuten bei 100°C erhitzt. Die Gele wurden entweder über Nacht bei 12 mA oder bei 40 mA laufen gelassen.

2.11.1 Lokalisierung nicht-radioaktiver Banden

Die Gele wurden 30 Minuten mit Coomassieblaulösung (0.25% Coomassie Brilliant Blue G 250, 50% Methanol in Wasser) gefärbt und mit Entfärber (5% Methanol, 7% Eisessig in Wasser) so lange entfärbt, bis die Banden deutlich zu erkennen waren.

Zur Silberfärbung wurden die Gele 2 mal 30 Minuten in 10% Trichloressigsäure und 30 Minuten in Methanol / Essigsäure / Wasser (5:1.2:3.8) fixiert. Danach wurde 2 mal 10 Minuten

mit Wasser gewaschen. Für weitere 15 Minuten wurde mit 1% Glutaraldehyd, 1% Natriumtetraborat in Wasser fixiert. Nach gründlichem Waschen wurde das Gel mit der Silberlösung (0.8 g AgNO_3 in 4 ml Wasser werden langsam zu einer Lösung aus 50 ml H_2O , 1.84 ml 1 n NaOH und 1.96 ml 25% NH_3 gegeben; ad 100 ml mit Wasser) 15 Minuten angefärbt. Nach kurzem Waschen wurden die Banden durch Zugabe der Reduzierlösung (10 ml abs. Ethanol, 0.6 ml 1% Zitronensäure, 50 [l 37% Formaldehyd; ad 100 ml mit Wasser) sichtbar gemacht.

2.11.2 Fluorographie und Autoradiographie

Für die Fluorographie wurden die Gele 2 x 30 Minuten in Essigsäure fixiert und 3 Stunden mit 20% PPO in Essigsäure fixiert (154). Danach wurden die Gele gründlich mit Wasser gewaschen und getrocknet. Die Filme wurden 24 Stunden bei -70°C exponiert.

Die ^{125}J -markierten Gele wurden getrocknet und je nach aufgetragener Radioaktivität zwischen 10 Minuten und 24 Stunden exponiert.

2.12 Immunologische Methoden

2.12.1 Immunisieren von Kaninchen

Das 52 kd Protein wurde aus einem präparativen Gel nach Coomassiefärbung ausgeschnitten und die Proteinmenge bestimmt, indem der prozentuale Anteil der Bande im Vergleich zu den anderen geschätzt und aus der Gesamtmenge an Protein der Anteil der Bande berechnet wurde.

Ein ca. 100 μg proteinenthaltendes Acrylamidstück wurde zerkleinert und in 1 - 2 ml PBS homogenisiert. Anschließend wurden 1 - 2 ml Freund'sches Adjuvans zugegeben und so lange homogenisiert, bis eine milchig trübe Suspension entstand. Die Injektion erfolgte subkutan 3 mal im 2 Wochenabstand mit komplettem Freund'schem Adjuvans und 1 Woche später wurde

mit inkomplettem Freund'schem Adjuvans geboostert. 14 Tage später wurde aus der zentralen Arterie des Ohrs Blut abgenommen.

2.12.2 Aufarbeitung des Serums

Die Bildung des Blutkuchens erfolgte über Nacht bei 4°C. Dieser wurde 2 mal in 30 Minuten bei 9000 rpm abzentrifugiert. Zum erhaltenen Serum wurde unter Rühren tröpfchenweise bei 4°C das gleiche Volumen kalter, gesättigter $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung zugegeben und 45 Minuten bei 4°C gerührt. Der Niederschlag setzte sich über Nacht ab und wurde dann 30 Minuten bei 10000 rpm abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 1 ml kalter 50% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ -Lösung pro ml Serum resuspendiert und 45 Minuten bei 4°C gerührt. Der Niederschlag wurde erneut zentrifugiert. Diese Waschprozedur wurde nochmals wiederholt. Das Pellet wurde in kaltem Wasser suspendiert und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durch Dialyse gegen Wasser entfernt. Diese Lösung wurde lyophilisiert und das Gewicht des Lyophilisats bestimmt. Aus der Division des Gewicht des Lyophilisats durch die ml Serum wurde das Äquivalentgewicht berechnet, das, gelöst in Puffer, die ursprüngliche Serumkonzentration widerspiegelt.

2.12.3 Immunoblot

Die zu untersuchenden Proben wurden auf einem 10% Acrylamid Gel und bei 4°C über Nacht bei 0.3 A auf Nitrozellulose (Bio-Rad) transferiert (155). Die Zellulosestreifen wurden mit 4% NZS/PBS 30 Minuten abgesättigt und anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Markerproteine wurden entweder mit 'Fast-Green' oder Amido Schwarz angefärbt. Das Zellulosepapier wurde nach dem Trocknen 10 Minuten in 2% NZS/PBS gewaschen und 1 Stunde mit 1:800 verdünnter Antikörperlösung (in 2% NZS/PBS) unter Schütteln inkubiert. Nach 3maligem 10minütigem Waschen mit 2% NZS/PBS wurde 1 Stunde mit Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:800 in 2%

NZS/PBS) geschüttelt und wieder 3 mal 10 Minuten gewaschen. Zur Intensivierung der Banden wurde 1 Stunde mit dem Peroxidase-anti-Peroxidase Komplex (PAP) (1:4000 in 2% NZS/PBS) (156) inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde die Nitrozellulose mit 50 mg 3,3'-Diaminobenzidin, 68 mg Imidazol, 2.4 ml 1% CoCl_2 in 100 ml PBS versehen und die Reaktion durch Zugabe von 20 μl 30% H_2O_2 gestartet. Waren die Banden deutlich sichtbar (maximal nach 1 Minute), dann wurde die Inkubationslösung verworfen, die Nitrozellulose mit Wasser gewaschen und getrocknet.

Zur Einsparung von Antikörpern wurde die Nitrozellulose bei den Inkubationen in Folie eingeschweißt.

Die Vorversuche zur Dot-Blot-Bestimmung erfolgten nach den gleichen Inkubationsbedingungen. Auf Nitrozellulosepapier wurden jeweils 2 μl Membranlösung getupft und über Nacht trocknen gelassen.

2.12.4 Immunoaffinitätssäule

5 ml Affi-Gel 10 (BioRad) wurden mit 3 Volumina Wasser gewaschen und vorsichtig unter Vakuum abgesaugt, so daß das Gel nicht völlig trocken wurde. Das Gel wurde über Nacht bei 4°C mit 3 mg/ml Antikörper in 10 ml Kopplungspuffer (0.2 M NaHCO_3 , 0.5 M NaCl pH 8.5) sachte geschüttelt. Nach dem Absaugen des Puffers wurden überschüssige Bindungsstellen mit 0.2 ml/ml Gel 1 M Ethanolamin/HCl pH 8 1 Stunde bei 4°C abgesättigt. Nach dem Füllen der Säule wurde mit Kopplungspuffer gewaschen, bis bei 280 nm kein Protein mehr detektiert werden konnte. Um schlecht gebundene Proteine herauszuwaschen wurde mit 1 Volumen Elutionspuffer (0.1 M Glycin/HCl pH 3.5) gewaschen und danach das Gel mit 10 Säulenvolumina Auftragepuffer (2 x PBS, 10 mM MgCl_2 , 0.1% Glycerin) äquilibriert. 10 ml Streptokokkenüberstand wurden mit Auftragepuffer auf 100 ml verdünnt und 4 mal über die Säule gegeben. Anschließend wurde mit dem Auftragepuffer gespült, bis bei 280 nm wieder die Grundlinie erreicht wurde.

Eluiert wurde mit 2 Säulenvolumen Elutionspuffer. Pro Fraktion wurden 40 Tropfen gesammelt. Die gesammelten Fraktionen wurden sofort mit 3 M Trislösung auf pH 7 titriert und mit Phospholipidlösung versehen (s.G.2.9)

2.12.4 Immunfluoreszenz

B6-Zellen und Streptokokken wurden in Lösung angefärbt. Nach der Färbung wurde ein Tropfen dieser Lösung auf einen Objektträger gebracht und mit einem Deckgläschen bedeckt.

Die Fixierung und Permeabilität der Zellen wurde mit verschiedenen Reagenzien versucht:

- a) abs. Aceton 3 Minuten bei 4°C, oder 20 Sekunden bei -20°C
- b) Fixierung mit 3% Paraformaldehyd in 1 mM Mg^{2+} /1 mM Ca^{2+} /PBS 20 Minuten bei 0°C, die Permeabilität der Membran wurde mit 0.1 % Triton X-100 im gleichen Puffer 5 Minuten bei Raumtemperatur oder 5 Minuten bei 0°C erreicht.

Danach wurden die Zellen entweder 3 mal 5 Minuten mit 1 mM Mg^{2+} /1 mM Ca^{2+} /PBS gewaschen, oder vorher 30 Minuten bei Raumtemperatur mit 10 mM Glycin behandelt. Der erste Antikörper wurde mit einer Verdünnung von 1:80 im Waschpuffer 1 Stunde bei Raumtemperatur mit den Zellen inkubiert. Nach der darauffolgenden Waschprozedur wurden die Zellen mit FITC-gekoppelten Ziege-anti-Kaninchen IgG (1:40) im Dunkeln 1 Stunde behandelt. Nach intensivem Waschen konnten die Zellen im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden.

Zum Teil wurde auch eine Immunfärbung durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach der oben beschriebenen Fixierung wie im Immunoblot (s.G.2.12.3) beschrieben gefärbt.

H. LITERATURANGABEN

- (1) Hay, B.,
in 'Epithelial-Mesenchymal Interaction', ed. Fleisch-
mayer, R., Billingham, R.E., William & William, Balti-
more (1968)
- (2) Miller, E.J., Gay, S.,
Meth. Enzym. 144, 3-41 (1987)
- (3) Kleinmann, H.K., Klebe, R.J., Martin, G.R.,
J. Cell Biol. 88, 473-485 (1981)
- (4) Triscott, M.X., van de Rijn, I.,
J. Biol. Chem. 261, 6004-6009 (1986)
- (5) Meyer, K., Palmer, J.W.,
J. Biol. Chem. 107, 629-634 (1934)
- (6) Lindahl, U., Rodén, L.,
J. Biol. Chem. 241, 2113-2119 (1966)
- (7) Baker, J., Cifonelli, J.A., Rodén, L.,
Connect. Tissue Res. 3, 149-156 (1975)
- (8) Nilsson, B., Nakazawa, K., Hassel, J.R., Newsome D.A.,
Hascall, V.C.,
J. Biol. Chem. 258, 6056-6063 (1983)
- (9) Bray, B.A., Liebermann, R., Meyer, K.,
J. Biol. Chem. 242, 3373-3380 (1967)
- (10) Seno, N., Toda, N.,
Biochim. Biophys. Acta 215, 544-546 (1970)
- (11) Stevens, J.W., Oike, Y., Handley, C., Hascall, V.C.,
Hampton, A., Caterson, B.,
J. Cell. Biochem. 26, 247-259 (1984)
- (12) De Luca, S., Lohmander, S., Nilsson, B., Hascall,
V.C., Caplan, A.I.,
J. Biol. Chem. 255, 6077-6083 (1980)
- (13) Caplan, A.J.,
in '39th-Symposium of the Soc. Develop. Biol.' ed.
Subtelny, S., Abbott, U.K.; A.R. Liss. New York (1981)
- (14) Hardingham, T.E., Muir, H.,
Biochim. Biophys. Acta 279, 401-405 (1972)
- (15) Kempson, G.E., Muir, H., Swanson, S.A.V., Freeman,
M.A.R.,
Biochim. Biophys. Acta 215, 70-77 (1970)
- (16) Hanover, J.A., Lennarz, W.J.,
Arch. Biochem. Biophys. 211, 1-19 (1981)
- (17) Stow, J.L., Kjellen, L., Unger, E., Höök, M., Far-

- guhar, M.G.,
J. Cell Biol. 100, 975-980 (1985)
- (18) Meyer, F.A., Koblentz, M., Silberberg, A.,
Biochem. J. 161, 285-291 (1977)
- (19) Sundblad, L.,
in 'The Amino Sugars', ed. Balazs, E.A., Jeanloz,
R.W.; Academic Press, New York und London, Vol. IIA,
229-250 (1965)
- (20) Balazs, E.A.,
in 'The Amino Sugars', ed. Balazs, E.A., Jeanloz,
R.W.; Academic Press, New York und London, Vol. IIA,
401-460 (1965)
- (21) Szirmair, J.A.,
in 'The Amino Sugars', ed. Balazs, E.A., Jeanloz,
R.W.; Academic Press, New York und London, Vol IIB,
129-154 (1966)
- (22) Delpech, B., Bertrand, P., Maingonnat, C.,
Anal. Biochem. 149, 555-565 (1985)
- (23) Toole, B.P.,
in 'Cell Biology of the Extracellular Matrix', ed.
Hay, E.D.; Plenum Press, New York, 259-294 (1981)
- (24) Bernfield, M., Banerjee, S.D., Koda, J.E., Rapraeger,
A.C.,
in 'Role of the Extracellular Matrix in Development',
ed. Trelstrad, R.L.; Liss A.R., inc. New York, 545-572
(1984)
- (25) Toole, B.P.,
Dev. Biol. 29, 321-329 (1972)
- (26) Meier, S., Hay, E.D.,
Dev. Biol. 35, 318-331 (1973)
- (27) Wiebkin, O.W., Muir, H.,
J. Cell Sci. 27, 199-211 (1977)
- (28) Solursh, M.,
Dev. Biol. 50, 525-530 (1976)
- (29) Solursh, M., Morris, G.M.,
Dev. Biol. 57, 75-86 (1977)
- (30) Derby, M.A.,
Dev. Biol. 66, 321-336 (1978)
- 31) Belsky, E., Toole, B.P.,
Cell Differentiation 12, 61-66 (1983)
- (32) Kujawa, M.J., Pechak, D.G., Fiszman, M.Y., Caplan,
A.I.,
Dev. Biol. 113, 10-16 (1986)
- (33) Kujawa, M.J., Caplan, A.I.,

Dev. Biol. 114, 504-518 (1986)

- (34) Atherly, A.G., Barnhart, B.J., Kraemer, P.M.,
J. Cell. Physiol. 90, 375-386 (1977)
- (35) Mikuni-Takagaki, Y., Toole, B.P.,
J. Cell Biol. 85, 481-488 (1980)
- (36) Clariss, B.J., Fraser, J.R., Rodda, S.J.,
Ann. Rheum. Dis. 33, 240-242 (1974)
- (37) Patterson, R.L., Peterson, D.A., Dienhart, F., Howard,
F.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149, 594-598 (1975)
- (38) Cöster, L., Carlstedt, I., Malmström, A.,
Biochem. J. 183, 669-681 (1979)
- (39) Yamada, K., Kennedy, D.W., Kimata, K., Pratt, R.M.,
J. Biol. Chem. 255, 6055-6063 (1980)
- (40) Jilek, F., Hörmann, H.,
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 597-603 (1979)
- (41) Underhill, C.B., Toole, B.P.,
J. Cell Physiol. 110, 123-128 (1982)
- (42) Goldberg, R.L., Seidman, J.D., Chi-Rosso, G., Toole,
B.P.,
J. Biol. Chem. 259, 9440-9446 (1984)
- (43) Underhill, C.B., Thurn, A.L., Lacy, B.E.,
J. Biol. Chem. 260, 8128-8133 (1985)
- (44) Underhill, C.B.,
J. Cell Sci. 56, 177-189 (1982)
- (45) Toole, B.P., Goldberg, R.L., Chi-Rosso, G., Underhill,
C.B., Orkin, R.W.,
in 'The Role of the Extracellular Matrix in
Development', ed. Trelstad, R.L.; Liss, A.R., Inc. New
York, 43-66 (1984)
- (46) Bartold, B.M., Page, R.C.,
Collagen Rel. Res. 6, 365-378 (1986)
- (47) Appel, A., Horwitz, A.L., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 254, 12199-12203 (1979)
- (48) Kapoor, R., Bourier, S., Prehm, P.,
FEBS Lett. 152, 183-186 (1983)
- (49) Lafuma, C., Moczar, M., Lange, F., Robert, L.,
Connect. Tissue Res. 13, 169-179 (1985)
- (50) Toole, B.P., Biswas, C., Gross, J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 6299-6303 (1979)
- (51) Angello, J.C., Danielson, K.G., Anderson, L.W.,
Hosick, H.L.,

Cancer Res. 42, 2207-2210 (1982)

- (52) Hamerman, D., Todaro, G.J., Green, H.,
Biochim. Biophys. Acta 101, 343-351 (1965)
- (53) Ishimoto, N., Temin, H.M., Strominger, J.L.,
J. Biol. Chem. 241, 2052-2057 (1966)
- (54) Satoh, C., Duff, R., Rapp, F., Davidson, E.A.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 54-56 (1973)
- (55) Hopwood, J.J., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 252, 4777-4785 (1977)
- (56) Underhill, C.B., Keller, J.M.,
Biochem. Biophys. Res. Com. 63, 448-454 (1975)
- (57) Mikuni-Takagaki, Y., Toole, B.P.,
J. Biol. Chem. 254, 8409-8415 (1979)
- (58) McBride, W.H., Bard, J.B.L.,
J. Exp. Med. 149, 507-515 (1979)
- (59) Balazs, E.A., Watson, D., Duff, I.F., Roseman, S.,
Arthritis Rheum. 10, 357-376 (1967)
- (60) Engström-Laurent, A., Hällgren, R.,
Ann. Rheum. Dis. 44, 83-88 (1985)
- (61) McCord, J.M.,
Science 185, 529-530 (1974)
- (62) Greenwald, R.A., Moy, W.W.,
Arthritis and Rheumatism 23, 455-463 (1980)
- (63) Freeman, B.A., Crapo, J.D.,
Lab. Invest. 47, 412-426 (1982)
- (64) Dahl, L.B., Dahl, I.M.S., Engström-Laurent, A.,
Granath, K.,
Ann. Rheum. Dis. 44, 817-822 (1985)
- (65) Glaser, L., Brown, D.H.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 41, 253-260 (1955)
- (66) Markovitz, A., Cifonelli, J.A., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 234, 2343-2350 (1959)
- (67) Markovitz, A., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 237, 273-279 (1962)
- (68) Philipson, L.H., Schwartz, N.B.,
J. Biol. Chem. 259, 5017-5023 (1984)
- (69) Prehm, P.,
Biochem. J. 220, 597-600 (1984)
- (70) Barland, P., Smith, C., Hamerman, D.,
J. Cell Biol. 37, 13-26 (1968)

- (71) Mitchell, D., Hardingham, T.,
Biochem. J. 202, 249-254 (1982)
- (72) Sugahara, K., Schwartz, N.B., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 254, 6252-6261 (1979)
- (73) Hart, G.W., Lennarz, W.J.,
J. Biol. Chem. 253, 5793-5801 (1978)
- (74) Fraser, J.R.E., Baxter, E.,
Connect. Tissue Res. 12, 287-296 (1984)
- (75) Mikuni-Takagaki, Y., Toole, B.P.,
J. Biol. Chem. 256, 8463-8469 (1981)
- (76) Prehm, P.,
Biochem. J. 211, 181-189 (1983)
- (77) Prehm, P.,
Biochem. J. 211, 191-198 (1983)
- (78) Stoolmiller, A.C., Dorfman, A.,
J. Biol. Chem. 244, 236-246 (1969)
- (79) Mian, N.,
Biochem. J. 237, 343-357 (1986)
- (80) Mian, N.,
Biochem. J. 237, 333-342 (1986)
- (81) Prehm, P., Mausolf, A.,
Biochem. J. 235, 887-889 (1986)
- (82) Moscatelli, D., Rubin, H.,
Nature 254, 65-66 (1975)
- (83) Moscatelli, D., Rubin, H.,
J. Cell. Physiol. 91, 79-88 (1976)
- (84) Tomida, M., Koyama, H., Ono, T.,
J. Cell Physiol. 86, 121-130 (1975)
- (85) Lembach, K.J.,
J. Cell. Physiol. 89, 277-288 (1976)
- (86) Hamerman, D., Sasse, J., Klagsbrun, M.,
J. Cell. Physiol. 127, 317-322 (1986)
- (87) Wu, R., Wu, M.M.J.,
J. Cell. Physiol. 127, 73-82 (1986)
- (88) Hamerman, D., Wood, D.D.,
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 177, 205-210 (1984)
- (89) Tomida, M., Koyama, H., Ono, T.,
Biochem. J. 162, 539-543 (1977)
- (90) Nishikawa, H., Mori, I., Umemoto, J.,
Arch. Biochem. Biophys. 240, 146-153 (1985)

- (91) Knudson, W., Biswas, C., Toole, B.P.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 6767-6771 (1984)
- (92) Laurent, T.C.,
in 'Chemistry and Molecular Biology of the Intercellular Matrix', ed. Balazs, E.A.; Academic Press, London, New York, 703-732 (1970)
- (93) Royal, P.D., Sparks, K.J., Goetinck, P.F.,
J. Biol. Chem. 255, 9870-9878 (1980)
- (94) Vasan, N., Lamb, K.M., la Manna O.,
Cell Differentiation 18, 91-99 (1986)
- (95) Kujawa, M.J., Carrino, A.D., Caplan, A.I.,
Dev. Biol. 114, 519-528 (1986)
- (96) Laurent, T.C., Fraser, J.R.E., Pertoft, H., Smedsrød, B.,
Biochem. J. 234, 653-658 (1986)
- (97) Underhill, C.B., Toole, B.P.,
J. Biol. Chem. 255, 4544-4549 (1980)
- (98) Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J.,
in 'Molecular Cloning - A Laboratory Manual'; Cold Spring Harbor Laboratory, New York 194-195 (1982)
- (99) van de Rijn, I.,
J. Bacteriol. 156, 1059-1065 (1983)
- (100) Warren J.,
Biomatrix, Inc. SOP BXS-4208
- (101) Bitter, T., Muir, M.M.,
Anal. Biochem. 4, 330-334 (1962)
- (102) Tomida, M., Koyama, H., Ono, T.,
Biochim. Biophys. Acta 338, 352-363 (1974)
- (103) Berman, E.R.,
Biochim. Biophys. Acta 58, 120-122 (1962)
- (104) Orkin, R.W., Underhill, C.B., Toole, B.P.,
J. Biol. Chem. 257, 5821-5826 (1982)
- (105) Underhill, C.B., Toole, B.P.,
J. Cell. Biol. 82, 475-484 (1979)
- (106) Underhill, C.B., Toole, B.P.,
Exp. Cell Res. 131, 419-423 (1981)
- (107) Chi-Rosso, G., Toole, B.P.,
J. Cell. Biochem. 33, 173-183 (1987)
- (108) Bates, E.J., Johnson, C.C., Lowther, D.A.,
Biochim. Biophys. Acta 838, 221-228 (1985)
- (109) Oberley, L.W., Spitz, D.R.,
Meth. Enzym. 105, 457-464 (1984)

- (110) Cooper, B., Creeth, J.M., Donald, A.S.R.,
Biochem. J. 228, 615-628 (1985)
- (111) Mapleson, J.L., Buchwald, M.,
J. Cell. Physiol. 109, 215-222 (1981)
- (112) Bansal, M.K., Mason, R.M.,
Biochem. J. 236, 515-519 (1986)
- (113) Barnhart, B.J., Cox, S.H., Kraemer, P.M.,
Exp. Cell Res. 119, 327-332 (1979)
- (114) Kraemer, P.M., Tobey, R.A.,
J. Cell Biol. 55, 713-717 (1972)
- (115) Otto, A.M., Mühlradt, P.F.,
J. Supramol. Struct. 13, 281-294 (1980)
- (116) Pardee, A.B., Dubrow, R., Hamlin, J.L., Kletzien,
R.F.,
Ann. Rev. Biochem. 47, 715-750 (1978)
- (117) Vasiliev, Ju.M., Gelfand, I.M., Domnia, L.V., Ivanova,
O.Y., Komm, S.G., Olshevskaja, L.V.,
J. Embryol. Exp. Morphol. 24, 625-640 (1970)
- (118) Montelaro, R.C., Bolognesi, D.P.,
Anal. Biochem. 99, 92-96 (1979)
- (119) Brunette, D.M., Till, J.E.,
J. Membr. Biol. 5, 215-224 (1971)
- (120) Prehm, P.,
Persönliche Mitteilung
- (121) Brecht, M.,
Diplomarbeit, Universität Tübingen (1987)
- (122) Lehninger, A.L.,
in 'Biochemistry', Verlag Chemie, Weinheim, New York,
647 (1979)
- (123) Hershey, J.W.B., Monro, R.E.,
J. Mol. Biol. 18, 68-76 (1966)
- (124) Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L., Kraus, H.M.,
J. Biol. Chem. 246, 1877-1882 (1971)
- (125) Yount, R.G., Babcock, D., Ballantyne, Wm., Ojala, D.,
Biochemistry 10, 2484-2489 (1971)
- (126) Hudson, L., Hay, F.C.,
in 'Practical Immunology'; Blackwell Sci. Pub., Oxford
(1976)
- (127) Kristiansen, T.,
in 'Affinity Chromatography', ed. Hoffman-Ostenhof;
Pergamon Press, Oxford 191-206 (1978)
- (128) Scott, J.F., Fraccastoro, A.P., Taft, E.B.,

- J. Histochem. Cytochem. 4, 1-10 (1956)
- (129) Lau, E.C., Ruch, J.V.,
Anal. Biochem. 130, 237-245 (1983)
- (130) Prehm, P.,
Biochem. J. 225, 699-705 (1985)
- (131) Okada, C.Y., Rechsteiner, M.,
Cell 29, 33-41 (1982)
- (132) Schlosser, E.,
Doktorarbeit, Universität München (1988)
- (133) Klein, U., von Figura, K.,
Biochim. Biophys. Acta 630, 10-14 (1980)
- (134) Venuta, S., Rubin, H.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 653-657 (1973)
- (135) Turley, E.A., Torrance, J.,
Exp. Cell Res. 161, 17-28 (1984)
- (136) Underhill, C.B., Green, S.J., Comoglio, P.M., Tarone,
G.,
J. Biol. Chem. 262, 13142-13146 (1987)
- (137) Carpenter, G., Cohen, S.,
in 'Receptor Regulation', ed Lefkowitz, R.J.; Chapman
and Hall, London, New York, 41-66 (1981)
- (138) Prehm, P.,
Persönliche Mitteilung
- (139) Chapman, J.D., Webb, R.G., Borsa, J.,
J. Cell Biol. 49, 229-233 (1971)
- (140) Mayer, U., Prehm, P.,
Submitted to Biochem. J.
- (141) Kraemer, P.M., Barnhart, B.J.,
Exp. Cell Res. 114, 153-157 (1978)
- (142) Barnhart, B.J., Cox, S.H., Kraemer, P.M.,
Exp. Cell Res. 119, 327-332 (1979)
- (143) Turley, E.A., Bowman, P., Kytryk, M.A.,
J. Cell Sci. 78, 133-145 (1985)
- (144) Holmström, B., Ricina, B.,
Appl. Microbiol. 15, 1409-1413 (1962)
- (145) Evans, W.H.,
in 'Laboratory Techniques', ed. Work, T.S., Work, E.;
North Holland, Amsterdam, Vol. 7, 1-259
- (146) Bradford, M.,
Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)
- (147) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randell,

- R.J.,
J. Biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- (148) Prehm, P.,
FEBS Lett. 111, 295-298 (1980)
- (149) Winterbourne, D.J., Mora, P.T.,
J. Biol. Chem. 253, 5109-5120 (1978)
- (150) Scott, J.E.,
in 'Methods of Biochemical Analysis', ed. Glick, D.;
Wiley (Interscience), New York, Vol. VIII, 145-197
(1960)
- (151) Racker, E., Violand, B., O'Neal, S., Alfonso, M., Telford, J.,
Arch. Biochem. Biophys. 198, 470-477 (1979)
- (152) Kagawa, Y., Racker, E.,
J. Biol. Chem. 246, 5477-5487 (1971)
- (153) Lämmlí, U.K.,
Nature 227, 680-685 (1970)
- (154) Bonner, W.M., Laskey, R.A.,
Eur. J. Biochem. 46, 83-88 (1974)
- (155) Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J.,
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354 (1979)
- (156) Sternberger, L.A., Hardy, P.H.Jr., Cuculis, J.J.,
Meyer, H.G.,
J. Histochem. Cytochem. 18, 315-333 (1970)

Lebenslauf:

Ulrike Mayer

geboren am 7.5.58 in Gengenbach/Baden-Württemberg

Eltern: Hermann Mayer,
Karolina Mayer, geb. Hug

1965-1968: Besuch der Grund- und Hauptschule Ortenberg

1968-1977: Mädchengymnasium, Kloster Unserer Lieben Frau
in Offenburg

1977 : Abitur

1977-1980: Studium der Lebensmittelchemie an der
Universität Stuttgart

1980-1984: Studium der Chemie an der Albert-Ludwig-
Universität Freiburg
Hauptfächer: Organische Chemie und
Biochemie

1984 : Diplomarbeit am Institut für Organische Chemie
Titel: Beiträge zur Addition von Nukleophilen an
Arylidenmalonsäurederivate
Betreuer: Prof. Dr. K. Friedrich

1985-1987: Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung Bindegebforschung (Leiter: Prof. Dr.
K. Kühn)

Titel: Hyaluronat:
Abspaltungsmechanismus und Syntheserate
im Zellzyklus

Betreuer: Dr. P. Prehm

